NEUROTRANSMITTER–INDUZIERTE INTRAZELLULÄRE IONENBEWEGUNGEN UND TRANSPORTMECHANISMEN BEI SYMPATHISCHEN SÄUGETIERNEURONEN

KLAUS BALLANYI

Diss
München
1984

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546002_0023

NEUROTRANSMITTER-INDUZIERTE INTRAZELLULÄRE IONENBEWEGUNGEN UND TRANSPORTMECHANISMEN BEI SYMPATHISCHEN SÄUGETIERNEURONEN.

Dissertation der Fakultät für Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Klaus Ballanyi
aus
München
Februar 1984

1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Neuweiler

2. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Zettler

Sondergutachter: Prof. Dr. G. ten Bruggencate

Tag der mündlichen Prüfung: 4. Juli 1984

Herstellung: Hieronymus Buchreproduktions GmbH, München

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1	EINLEITUNG	1
1.1	Membrangebundene Ionen-Transportsysteme	1
1.2	Ionenverschiebungen bei neuronaler Aktivität	4
1.3	Ionensensitive Mikroelektroden	5
1.4	Ionale Mechanismen bei Rezeptoraktivierung	6
2	METHODE	8
2.1	Präparation	8
2.2	Versuchsbedingungen in vitro	8
2.3	Ionensensitive Mikroelektroden	12
2.3.1	Herstellung	12
2.3.2	Grundlagen	13
2.3.3	K^+ -sensitive Mikroelektroden	14
2.3.4	Na^+-sensitive Mikroelektroden	15
2.3.5	Cl^--sensitive Mikroelektroden	18
2.4	Elektrische Stimulation und Ableitung	22
2.4.1	Extrazellulär	22
2.4.2	Intrazellulär	22
2.5	Registrierung und Speicherung der Daten	24
3	ERGEBNISSE	25
3.1	Allgemeine Beobachtungen	25
3.2	Repetitive Stimulation	27

		Seite
3.3	Ionenbewegungen bei Rezeptoraktivierung	29
3.3.1	Effekte von Carbachol	29
3.3.2	Effekte von GABA	33
3.3.3	Vergleich der Effekte von Carbachol und GABA	38
3.4	Hemmstoffe von Ionen-Transportsystemen	42
3.4.1	Effekte von Ouabain	42
3.4.2	Effekte von Furosemid	50
3.4.3	Effekte von DIDS	51
3.4.4	Vergleich der Hemmstoffe von Ionen-Transportsystemen	55
4	DISKUSSION	57
4.1	Eigenschaften der Austauscherharze	57
4.2	Ruhewerte der freien Ionenkonzentrationen	59
4.3	Ionenbewegungen unter Carbachol	62
4.4	Ionenbewegungen unter GABA	66
4.5	Ausblick	71
5	ZUSAMMENFASSUNG	73
6	LITERATURVERZEICHNIS	75

1 Einleitung

1.1 Membrangebundene Ionen-Transportsysteme

Bei tierischen und pflanzlichen Zellen ist die unterschiedliche intra- und extrazelluläre Verteilung bestimmter Ionen eine wichtige Voraussetzung für die Erfüllung physiologischer Funktionen. Zur langfristigen Aufrechterhaltung der ionalen Konzentrationsgradienten über der Zellmembran und damit des intrazellulären Ionenmilieus dienen unterschiedliche Ionen-Transportsysteme. Dabei handelt es sich entweder um Enzyme (ATPasen) oder um sogenannte "carrier", deren molekulare Grundlagen noch nicht bekannt sind. Der bekannteste Mechanismus zur Regulation der freien intrazellulären Na^+-Konzentration ist die membrangebundene Na^+/K^+-ATPase ("Na^+/K^+-Pumpe"; Thomas, 1972 b). Bei Aktivierung der Na^+/K^+-Pumpe durch einen Anstieg der intrazellulären Na^+-Konzentration wird Na^+ aus der Zelle transportiert. Diese Na^+-Extrusion ist an einen Einwärtstransport von K^+ gekoppelt. Ist das Verhältnis des pro Pump-Zyklus ausgetauschten Na^+ und K^+ ungleich 1, so kommt es zu einem Nettotransport von Ladungen über die Membran. Bei vielen Präparaten ist hierbei das Verhältnis des transportierten Na^+ zu K^+ gleich 3 Na^+ : 2 K^+. Man spricht in diesem Fall von einem elektrogenen Transport.

Die Na^+/K^+-ATPase benötigt zur Aufrechterhaltung ihrer Aktivität Stoffwechselenergie in Form von ATP. Stoffwechselgifte wie z.B. 2-4-Dinitrophenol können daher die Na^+/K^+-ATPase reversibel blockieren. Im Gegensatz zu den Stoffwechselgiften gibt es Stoffe, welche die Na^+/K^+-Pumpe sowohl in vivo als auch in vitro spezifisch blockieren (Glynn, 1964; Lee & Klaus, 1971). Die bekannteste Substanz dieser Art ist das Herzglykosid Ouabain (g-Strophantin), ein Digitalis-Präparat, das z.B. bei verschiedenen Formen von Herzinsuffizienz klinisch eingesetzt wird. In der Anwesenheit von Ouabain kommt es infolge des blockierenden Effekts auf die Na^+/K^+-Pumpe zu einer intrazellulären Na^+-Anreicherung

und einem gleichzeitigen Verlust von intrazellulärem K^+.

Bei Erythrozyten und einer Vielzahl von anderen Präparaten wurde festgestellt, daß freigesetztes K^+ auch in Anwesenheit von Ouabain wieder in die Zellen aufgenommen werden kann. An diesen Ouabain-insensitiven, sogenannten "sekundär aktiven" Transportprozessen können auch Anionen wie z.B. Chlorid oder Bicarbonat beteiligt sein. So gibt es bei zahlreichen Zellen Hinweise auf Kationen-gekoppelte Transportprozesse für Cl^- (e.g. Ellory et al., 1982; Warnock & Eveloff, 1982). Hierbei handelt es sich in vielen Fällen um einen elektroneutralen, häufig bidirektionalen $Na^+/K^+/Cl^-$-Cotransport (1 Na^+ : 1 K^+ : 2 Cl^-). Bei diesem Cotransport werden sowohl K^+ als auch Cl^- entgegen ihren elektrochemischen Potentialgradienten in die Zellen aufgenommen ("Bergauf-Transport"). Während bei der oben beschriebenen Na^+/K^+-Pumpe die Energie für den Bergauf-Transport von K^+ bzw. Na^+ aus dem Stoffwechsel gewonnen wird, scheint beim $Na^+/K^+/Cl^-$-Cotransport der "zelleinwärts" gerichtete Na^+-Gradient die Energie für die Aufnahme von K^+ bzw. Cl^- bereitzustellen.

Im Gegensatz zu der Vielzahl von Befunden über diesen Kationen-gekoppelten Cl^--Transportmechanismus an den unterschiedlichsten Präparaten wie Erythrozyten (Wiley & Cooper, 1974; Dunham et al., 1980; Haas et al., 1982), Zellen in Kultur (bes. HeLa-Zellen; Aiton et al., 1981), Nierenzellen (Greger & Schlatter, 1981), oder Aszites-Tumorzellen (Geck et al., 1980) gibt es bei Nervenzellen bislang lediglich für das Riesenaxon des Tintenfischs Hinweise auf einen entsprechenden ionalen Regulationsmechanismus (Russell, 1983).

Die Bedeutung des $Na^+/K^+/Cl^-$-Cotransportes für die Zellhomöostase ist weitgehend unbekannt. Bei Epithelzellen mit niedrigem elektrischen Widerstand ist eine Beteiligung an der Regulation des Flüssigkeitstransportes, bei anderen Zellen hingegen an der Regulation des Zellvolumens denkbar (Musch et al., 1982). In Analogie zu Ouabain bei der Na^+/K^+-Pumpe gibt es Substanzen, die den $Na^+/K^+/Cl^-$-Cotransport spezifisch hemmen. Das Diuretikum Furosemid z.B. blockiert bei vielen Geweben einen großen Prozentsatz der Ouabain-insensitiven Fluxe für K^+ und Cl^- (Dunham et al., 1980; Frizzell et al., 1980; Schmidt & McManus, 1974).

Zusätzlich zu dem Kationen-gekoppelten Cl^--Transport gibt es einen weiteren Mechanismus, durch den Chlorid entgegen seinem elektrochemischen Potentialgradienten in die Zellen aufgenommen wird. Dieser scheint auf einem elektroneutralen 1:1 Austausch von Cl^- für HCO_3^- zu basieren (Cala, 1980; Knauf et al., 1977; Leslie et al., 1973). Die Energie für diesen Cl^--Transport wird dabei vermutlich dem elektrochemischen Potentialgradienten für HCO_3^- entnommen (Frizzell et al., 1979).

Der Cl^-/HCO_3^--Austausch scheint bei verschiedenen Präparaten wie Erythrozyten (Cala, 1980) oder Schneckenneuronen (Thomas, 1977) an der zellulären pH-Regulation beteiligt zu sein. Es gibt Substanzen, die diesen Anionen-Austausch spezifisch blockieren. Dazu zählen z.B. die Stilbene-Präparate DIDS und SITS (steroidale Östrogene), von denen angenommen wird, daß ihr inhibitorischer Effekt auf der Bindung an bestimmte Membranproteine beruht (Cabantchik & Rothstein, 1974; Cabantchik et al., 1978).

1.2 Ionenverschiebungen bei neuronaler Aktivität

Reiz-induzierte Aktivität von Nervenzellen führt zu Veränderungen der Ionengradienten über der Zellmembran und damit möglicherweise zu Veränderungen des Zellvolumens. Daraus ergibt sich auch für Nervenzellen die Notwendigkeit von ionalen Regulationsmechanismen der zellulären Homöostase.

Bei elektrischer Reizung oder Applikation von Neurotransmittern im zentralen und peripheren Nervensystem von Säugetieren wird von den Neuronen vorübergehend K^+ in den Extrazellulärraum freigesetzt (s. Übersichtsartikel von Nicholson, 1981; Somjen, 1979; Waltz & Hertz, 1983). Es wird allgemein angenommen, daß die Na^+/K^+-Pumpe für die neuronale Wiederaufnahme des freigesetzten K^+ verantwortlich ist. Diese Annahme wird unterstützt durch die Beobachtung, daß es bei verschiedenen Säugetierpräparationen im Anschluß an eine Reiz- oder Neurotransmitter-induzierte Erhöhung der extrazellulären K^+-Konzentration aufgrund einer verstärkten Aktivität der Na^+/K^+-Pumpe zu einem kurzzeitigen Absinken des K^+ unter seinen Basiswert kommt. Diese K^+-"undershoots" sind z.B. für den cerebralen Cortex der Katze (Heinemann & Lux, 1975; Lothman et al., 1975), für die Medulla oblongata und das Rückenmark der Katze (Kříž et al., 1975; Krnjevic' & Morris, 1975), sowie für das Kleinhirn (Ullrich et al., 1982) und sympathisches Ganglion bzw. Vagusnerv der Ratte (Förstl et al., 1982) beschrieben. Dabei bleibt bis jetzt die Frage offen, wie der Zeitverlauf der Reiz- oder Neurotransmitter-induzierten extrazellulären K^+-Veränderungen mit dem Zeitverlauf der intrazellulären Ionenverschiebungen und des Membranpotentials korreliert.

Zur Klärung dieser Frage und zur näheren Charakterisierung der Transportmechanismen bei neuronalen Ionenverschiebungen wurden in dieser Arbeit die Effekte verschiedener Neurotransmitter auf die intrazellulären Konzentrationen von Na^+, K^+

und Cl^-, die extrazelluläre K^+-Konzentration und das Membranpotential bei Neuronen des isolierten sympathischen Ganglion cervicale superius der Ratte mit Hilfe von doppelläufigen ionensensitiven Mikroelektroden untersucht.

1.3 Ionensensitive Mikroelektroden

Ionensensitive Mikroelektroden werden seit vielen Jahren in der analytischen Chemie zur Bestimmung der Ionenaktivitäten in Elektrolytlösungen verwendet (Buck, 1974). In den letzten Jahren wurden die Spitzendurchmesser dieser Elektroden beträchtlich verringert (ø ca. 1 µm), wodurch die Messung intrazellulärer Ionenaktivitäten möglich wurde (Walker & Brown, 1977; Thomas, 1978). Im Gegensatz zu anderen Methoden wie z.B. Flammphotometrie oder Fluxmessungen können mit intrazellulär positionierten doppelläufigen ionensensitiven Mikroelektroden Veränderungen von Membranpotential und intrazellulären Ionenkonzentrationen direkt, kontinuierlich und simultan gemessen werden. Dadurch kann man Aussagen über die Kinetik von intrazellulären Ionenbewegungen bei gleichzeitiger Kontrolle des Membranpotentials gewinnen.

Die bisherigen intrazellulären Messungen mit ionensensitiven Mikroelektroden beschränken sich zum größten Teil auf experimentell relativ leicht zugängliche Präparate wie Epithelzellen, Zellen in Kultur oder (Herz-) Muskelzellen. Entsprechende Untersuchungen am Nervensystem wurden hauptsächlich an relativ großen Neuronen von Schnecken (Thomas, 1969), vom Blutegel (Deitmer & Schlue, 1981, 1983) oder in der Bienen-Retina (Coles & Tsacopoulus, 1979) durchgeführt. Im Zentralnervensystem von Vertebraten wurden intrazelluläre Ionenaktivitäten bislang lediglich bei Motoneuronen des Frosches gemessen (Grafe et al., 1982; Bührle & Sonnhof, 1983 a, b). Bis heute jedoch fehlen Befunde über Messungen freier intrazellulärer Ionenkonzentrationen

bei Nervenzellen von Säugetieren. Dies liegt sowohl in der Komplexität des Säugetiernervensystems als auch in der geringen Größe seiner Neurone begründet.

Durch Verwendung eines speziellen Elektrodenziehgerätes (Brown & Flaming, 1977) gelang es nun, doppelläufige ionensensitive Mikroelektroden mit Spitzendurchmessern von vermutlich weit unter 0.3 µm herzustellen. Neben dem inhaltlichen Aspekt der Untersuchung von Ionen-Transportsystemen bei Säugetierneuronen stand bei dieser Arbeit daher der methodische Aspekt im Vordergrund, zu untersuchen, inwieweit doppelläufige ionensensitive Mikroelektroden dazu geeignet sind, intrazelluläre Ionenkonzentrationen simultan mit dem Membranpotential bei Säugetierneuronen zu messen.

1.4 Ionale Mechanismen bei Rezeptoraktivierung

Das Cervicalganglion der Ratte wurde als Säugetier-Präparat gewählt, da die Wirkungen der hauptsächlich verwendeten Substanzen Carbachol und γ-Aminobuttersäure (GABA) bei diesem Präparat bekannt sind. So weiß man, daß der Acetylcholinrezeptor-Agonist Carbachol zu einer Depolarisation und einer darauffolgenden Hyperpolarisation der Neurone des Cervicalganglions führt (Brown et al., 1972). Eine Aktivierung der GABA-Rezeptoren dieser Neurone resultiert ebenfalls in einer Membrandepolarisation (de Groat, 1970; Bowery & Brown, 1974; Adams & Brown, 1975). Dabei ist der ionale Mechanismus dieser Membrandepolarisationen für Carbachol und GABA unterschiedlich. Aktivierung des Acetylcholinrezeptors durch Carbachol führt zur Öffnung eines relativ unspezifischen Membrankanals für Kationen. Die Membran depolarisiert bei Öffnung dieses Kanals, weil das Gleichgewichtspotential $E_{Carbachol}$ als Mischpotential zwischen den Gleichgewichtspotentialen für Na^+ und K^+ (E_{Na} und E_K) liegt und positiv in Bezug auf das Ruhemembranpotential ist. Aktivierung der GABA-Rezep-

toren hingegen führt zur Öffnung von Cl^--Kanälen der Membran (Krnjević & Schwartz, 1967; Adams & Brown, 1975; Nicoll, 1978). Bei den Neuronen des Cervicalganglions der Ratte ist aufgrund einer angenommenen nicht-passiven Verteilung von Cl^- über der Zellmembran das Gleichgewichtspotential für Cl^- (E_{Cl}) positiver als E_K und das Ruhemembranpotential (Brown, 1979). Dadurch kommt es bei Öffnung des Cl^--Kanals durch GABA zu einem Ausstrom von Cl^- aus der Zelle und zu einer Depolarisation der Membran in Richtung auf E_{Cl}. Diese GABA-Depolarisation ist in vielen Fällen, ähnlich wie die Carbachol-Depolarisation, von einem vorübergehenden Anstieg der extrazellulären K^+-Konzentration (Deschenes & Feltz, 1976; Förstl et al., 1982; Kudo & Fukuda, 1976) begleitet.

Im Gegensatz zu den Ionenbewegungen bei Carbachol scheint es bei Applikation von GABA nicht zu einem Einstrom von Na^+ in die Zellen zu kommen. Das führt zu der Frage, wodurch bei GABA die Na^+/K^+-Pumpe aktiviert wird, oder ob es bei Nervenzellen von Säugetieren Mechanismen der ionalen Regulation zusätzlich zur Na^+/K^+-Pumpe gibt, wie unter 1.1 bereits für andere Präparate beschrieben wurde.

Um die Frage einer möglichen Beteiligung unterschiedlicher Transportsysteme an der Wiederherstellung der Ionengradienten nach Ende von Neurotransmitter-Aktionen näher zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit spezifische Hemmstoffe verschiedener ionaler Transportsysteme (Ouabain, Furosemid und DIDS, s. 1.1) verwendet.

Ein vorläufiger Bericht über Teile dieser Arbeit wurde bereits publiziert (Ballanyi et al., 1983).

2 Methode

2.1 Präparation

Die Experimente wurden am isolierten Ganglion cervicale superius der Ratte durchgeführt. Zur Präparation der Ganglien wurden Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 250 bis 350 g durch intraperitoneale Injektion von Urethan (1.5 g/kg Körpergewicht) narkotisiert. Nach Freilegung der ventralen Halsregion ließen sich Muskeln und Faszien unter optischer Kontrolle (Operationsmikroskop Zeiss, Vergrößerung 40 x) beseitigen. Das medial der Arteria carotis communis und interna gelegene Ganglion konnte nach Durchtrennung des prä- und postganglionären Nervenstranges sowie eines Seitenastes entnommen werden. Die Entfernung der Neuralscheide um das Ganglion gewährleistete eine ausreichende Sauerstoffversorgung des Präparates (Friedli, 1978; s.auch 2.2) und erlaubte das Einstechen der Mikroelektroden.

2.2 Versuchsbedingungen in vitro

Das Ganglion wurde in eine Superfusionskammer aus Plexiglas (Volumen 1.5 ml) überführt und der prä- bzw. postganglionäre Nervenstrang mit je einer Saugelektrode aus Glas fixiert (Abb. 1). Eine Kaltlichtquelle (Fibrox, Rank Taylor Hobson) ermöglichte eine adäquate Ausleuchtung des Präparates. Die oberflächlichen Ganglienzellen ließen sich bei 50-facher Vergrößerung durch eine Stereolupe (Leitz) erkennen. Die Zellen sind in der Regel elliptisch und haben Durchmesser zwischen 10 und 25 µm (Abb. 2). Zur kontinuierlichen Umspülung des Präparates diente eine Roller-Pumpe (Watson-Marlow 501 S, Durchflußrate 2.5 bis 8 ml/min).

Die Elektrolytlösung nach Krebs-Henseleit hatte folgende Zusammensetzung (in mmol/l): NaCl 118; KCl 4.8; $NaHCO_3$ 25; KH_2PO_4 1.2; $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ 1.2; $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$ 2.5 und D-Glucose 10. Der pH-Wert der Krebslösung und der Versuchslösungen wurde auf einen Wert von 7.4 durch kontinuierliche Begasung mit einer Mischung aus 95% O_2 und 5% CO_2 eingestellt. In einigen Experimenten wurde eine Bicarbonat-freie HEPES-gepufferte Ringerlösung mit folgender Zusammensetzung (in mmol/l) verwendet: NaCl 114; KCl 6.0; Na-Ethionat 25; $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$ 2.5; $MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$ 1.2; HEPES 6.0 und D-Glucose 10. Der pH-Wert dieser Lösung wurde mit NaOH auf 7.4 eingestellt. Die Versuchstemperatur wurde durch einen Thermostat (Thermomix 1441, B. Braun Melsungen AG) konstant bei 30°C gehalten. Für die Herstellung der Versuchslösungen wurden Substanzen in einer Endkonzentration unter 5 mmol/l zur Krebslösung addiert. Bei Endkonzentrationen über 5 mmol/l wurde eine äquimolare Substitution gegen entsprechende Kat- bzw. Anionen der Krebslösung vorgenommen.

An dem isolierten Ganglion konnten unter diesen "in vitro" Bedingungen länger als 15 Stunden Messungen durchgeführt werden, ohne daß eine Verschlechterung des Präparates (z.B. Abnahme der Amplitude des Summenaktionspotentials, s. 2.4.1 oder schlechtere intrazelluläre Ableitungen) feststellbar war.

Folgende Substanzen fanden für die Versuche Verwendung:
Carbachol, 4,4´-Diisothiocyano-2,2´-Disulfonsäure Stilbene (DIDS), Furosemid, γ-Aminobuttersäure (GABA), Hexamethonium, Na-D-Glucuronat, Ouabain, Tetrodotoxin, Veratridine, Hexamethyldisilazane (alle Sigma Chemie, München); Urethan (Merck, Darmstadt).

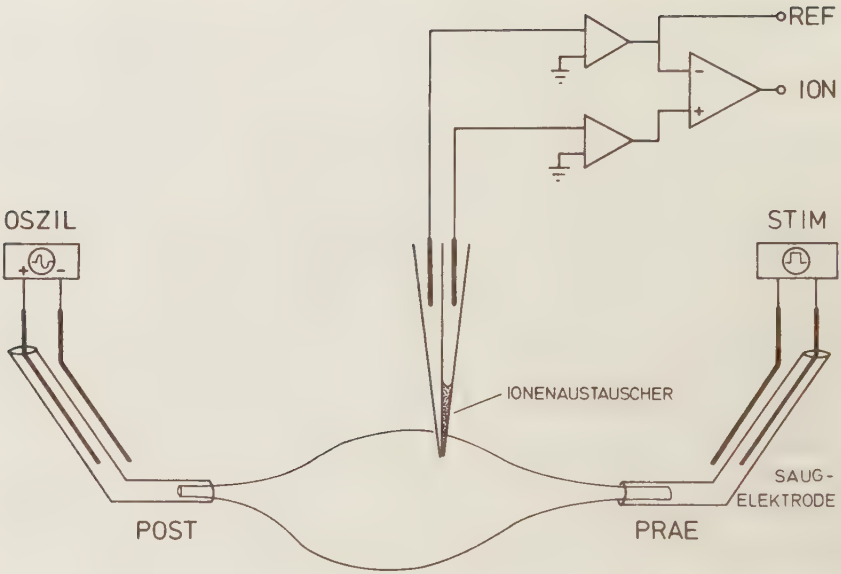

Abb. 1

Schematische Versuchsanordnung für Experimente am isolierten Cervicalganglion der Ratte. Das Präparat wurde nach Entfernung der Neuralscheide in die Organbadlösung überführt. Die präganglionären Nervenfasern konnten durch Rechteckspannungspulse zwischen dem inneren und dem äußeren chlorierten Silberdraht einer Saugelektrode aus Glas stimuliert werden. Das Summenaktionspotential der postganglionären Nervenfasern wurde als Spannungsabfall über den beiden chlorierten Silberdrähten der postganglionären Saugelektrode abgeleitet. Doppelläufige ionensensitive Mikroelektroden dienten zur synchronen Bestimmung von Membranpotential (REF) und intrazellulärer Ionenkonzentration. Das reine Ionensignal (ION) konnte als Spannungsabfall am Ausgang des Differenzverstärkers registriert werden.

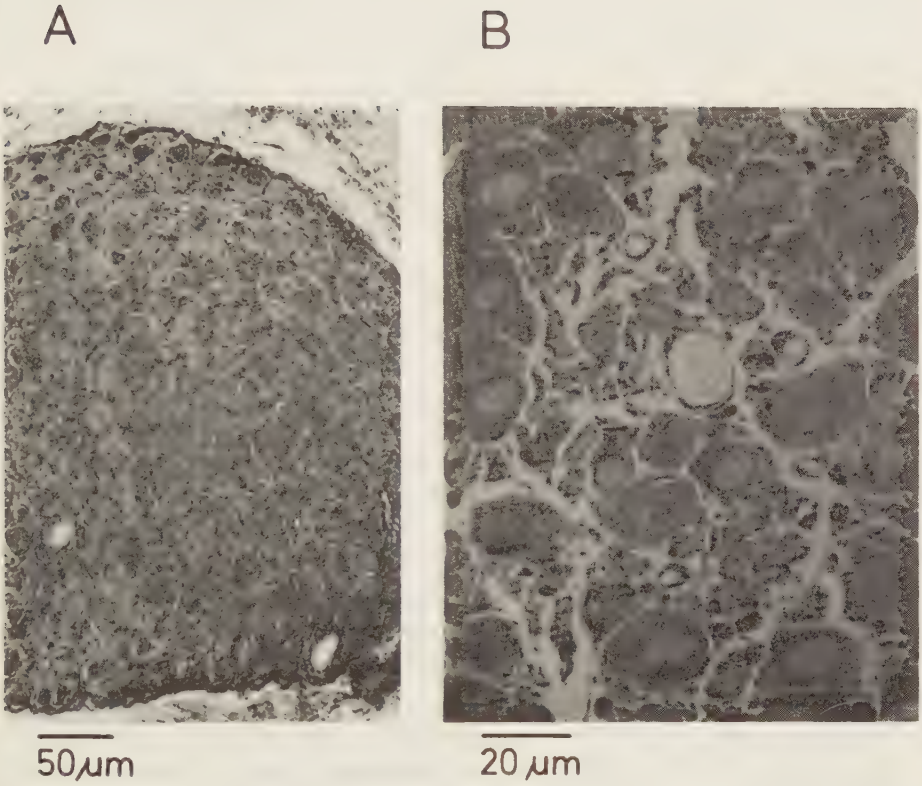

Abb. 2

Histologische Darstellung des Ganglion cervicale superius der Ratte. A: Lichtmikroskopische Aufnahme eines Querschnitts durch das Ganglion (Hämatoxilin-Färbung). Beachte die gleichmäßige Verteilung der Zellen über das Ganglion. B: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Zellen des Cervicalganglions (Die Aufnahme entstand im Rahmen der Arbeit Galvan et al., 1984 und wurde mir dankenswerterweise überlassen).

2.3 Ionensensitive Mikroelektroden

2.3.1 Herstellung

Zur Herstellung der doppelläufigen ionensensitiven Mikroelektroden (ISME) wurden handgezogene Borosilikat-Thetakapillaren mit Außendurchmessern von 2 bis 2.5 mm (Clark Electromedical Instruments) verwendet. Mit Hilfe eines horizontalen Elektrodenziehgerätes (Brown & Flaming, 1977) konnten von diesen Kapillaren Elektroden mit Spitzendurchmessern vermutlich unter 0.3 µm hergestellt werden. Die ungefüllten Elektroden wurden für ca. 10 min in einer Heizspirale getrocknet. Bei gleichzeitiger Durchgasung des Referenzkanals mit gereinigtem Stickstoff wurde ein Tropfen Hexamethyldisilazane in den später ionensensitiven Kanal eingebracht und füllte die Spitze dieser Seite. Unter ständiger Durchgasung des Referenzkanals wurde die Elektrode in der Heizspirale bei 400 ^{o}C für 20 min erhitzt, um durch eine Benetzung des normalerweise hydrophilen Glases mit dem Silan eine hydrophobe Oberfläche zu schaffen. Nach Beendigung dieser Heizphase wurde die Elektrode in einer Mikroschmiede (Beaudouin, Paris) befestigt. Anschließend an die Füllung der Referenzseite (mit 1 mol/l Mg-Azetat, 1 mol/l K-Azetat bzw. 0.5 mol/l Mg- oder K-Sulfat) wurde ein Tropfen eines Ionenaustauschers bzw. neutralen Liganden mit Hilfe eines fein ausgezogenen Plastikschlauches an der Schulter des ionensensitiven Kanals deponiert. Entlang eines Katzen-Schnurrhaares, das durch diesen Tropfen möglichst tief in die Elektrodenspitze vorgestoßen wurde, konnte der Ionenaustauscher in die Spitze gelangen. Eventuell verbleibende Luftblasen konnten in der Regel durch Hitze (Heizdraht der Mikroschmiede) entfernt werden. Der Schaft des ionensensitiven Kanals oberhalb des Austauschers wurde mit einer 200 mmol/l Lösung des zu messenden Ions (Cl^- als Anion; bei Cl^--ISME K^+ als Kation) aufgefüllt. Nach abschließendem Einbringen von je einem chlorierten Silberdraht in die Elektrolytlösungen beider Kanäle wurden die oberen Elektroden-

öffnungen mit Siegellack verschlossen. Danach konnte die Testung bzw. Eichung der ISME durchgeführt werden.

2.3.2 Grundlagen

Die Einflüsse von Meßionen und Störionen auf die elektromotorische Kraft an einer Ionenaustauschergrenzfläche lassen sich in erster Näherung durch die Nicolsky-Eisenman Gleichung, eine Erweiterung der Nernst-Gleichung, beschreiben:

$$E_{Ion} = E_o + S \cdot \log \left(a_i + \sum k_{ij}^{pot} \cdot a_j^{z_i/z_j} \right)$$

$$\text{mit} \quad S = n \cdot (R \cdot T / z_i \cdot F) \cdot \ln 10$$

Dabei bedeuten:

E_{ION} : das ionenselektive Meßzellenpotential (in mV)
E_0 : das Standardpotential
S : die Steigung der Elektrodenfunktion
a_i : die Aktivität des Meßions i
z_i : die Ladungszahl des Meßions i
a_j : die Aktivität des Störions j
z_j : die Ladungszahl des Störions j
K^{pot}_{ij} : der Selektivitätskoeffizient
R : die allgemeine Gaskonstante
T : die absolute Temperatur (in ^oK)
F : die Faradaykonstante
n : empirische Konstante, die die Abweichung der Steigung der Elektrodenfunktion von der idealen Nernstschen Steigung beschreibt.

Basierend auf diesem, theoretisch vorhersagbaren, Verhalten der ionensensitiven Mikroelektroden wurden die Elektroden getestet und geeicht. Dabei wurden jedoch, bedingt durch die unterschiedlichen Fragestellungen, verschiedene Verfahren angewandt.

Ionensensitive Mikroelektroden messen die Aktivität eines in Lösung befindlichen Ions. Zwischen der Aktivität und der Konzentration des Meßions besteht eine direkte Proportionalität. Der entsprechende Proportionalitätsfaktor wird als Aktivitätskoeffizient bezeichnet. Der Wert dieses Aktivitätskoeffizienten liegt z.B. für Na^+ oder K^+ in wäßriger Lösung mit einer physiologischen Ionenstärke von etwa 300 mmol/l bei ca. 0.75 (Robinson & Stokes, 1959; Walker & Brown, 1977. Da die verwendeten Eichlösungen mit jeweils gleicher Gesamtionenstärke das jeweilige Meßion in unterschiedlicher Konzentration enthielten, wurden alle Werte des intrazellulären Na^+ und Cl^- sowie des extra- und intrazellulären K^+ als freie Ionenkonzentrationen angegeben. Eine Umrechnung in Ionenaktivitäten wurde nicht durchgeführt. Die Bestimmungen der freien intrazellulären Konzentrationen von Na^+, K^+ und Cl^- basieren auf der Annahme, daß der intra- und der extrazelluläre Aktivitätskoeffizient des jeweiligen Ions identisch sind (Thomas, 1978).

2.3.3 K^+-sensitive Mikroelektroden

K^+-ISME, die mit dem Corning Ionenaustauscherharz (477317) bzw. in einigen Fällen mit einem Valinomycin-"cocktail" gefüllt waren, wurden vor und nach den Experimenten in der Krebslösung und in 3 verschiedenen Kalibrierungslösungen getestet (Abb. 3 A). Diese enthielten 3, 12 und 60 mmol/l KCl in Lösungen mit einer konstanten Hintergrundkonzentration von 150 mmol/l NaCl. Mit Hilfe eines Rechnerprogramms konnte durch Iteration aus diesen 3 Meßwerten die Steigung S der Elektrodenfunktion und der Selektivitätskoeffizient $K^{pot}_{K,Na}$ bestimmt werden (s.

Gleichung in 2.3.2). Für die Experimente wurden nur Elektroden mit einer Steigung von mehr als 50 mV/zehnfache Änderung der freien K^+-Konzentration verwendet. Die Mittelwerte für die Steigung und den Selektivitätskoeffizienten bei Zimmertemperatur betrugen 56.6 $\pm$ 4.4 mV bzw. 0.019 $\pm$ 0.008 (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung, n = 21). Die Werte für E_{ION} (Spannungssignal des ionensensitiven Kanals) wurden in Konzentrationen umgerechnet unter Einsetzen der bekannten Werte für E_{ION}, S und $K^{pot}_{K,Na}$ sowie der extrazellulären Na^+-Konzentration in die Nicolsky-Eisenman Gleichung. Für die Bestimmung der intrazellulären K^+-Konzentration wurde zusätzlich die Änderung der Na^+-Konzentration von bekannten extrazellulären Werten zu einer geschätzten intrazellulären Na^+-Konzentration (10 mmol/l) berücksichtigt. Das oben beschriebene Eichverfahren für K^+-Messungen im Extrazellulärraum konnte auch für die Valinomycin enthaltenden K^+-sensitiven Mikroelektroden angewandt werden.

2.3.4 Na^+-sensitive Mikroelektroden

Die intrazelluläre freie Na^+-Konzentration wurde bestimmt unter Verwendung eines Na^+-sensitiven Liganden (ETH 227; O´Doherty et al., 1979; Steiner et al., 1979), dem etwas K-Tetrachlorphenylborat beigemischt worden war. Das Selektivitätsverhältnis dieses Liganden betrug für $Ca^{++}:Na^+:K^+$ = 2-4:1:0.025. Die Na^+-ISME hatten Steigungen zwischen 42 und 55 mV /zehnfache Änderung des freien Na^+ bei Konzentrationen über 20 mmol/l. In niedrigeren Na^+-Konzentrationen waren die Steigungen der Elektroden möglicherweise aufgrund von Interferenzen mit anderen Ionen reduziert. Im Versuch wurde die freie intrazelluläre Na^+-Konzentration nicht durch Umrechnung der Spannungssprünge in Konzentrationen bestimmt, sondern durch Vergleich der Spannungsänderung beim Zurückziehen der Elektrode aus der Ganglienzelle in die Badlösung und den Spannungsänderungen von E_{ION}, die bei einem Wechsel der Bad-Krebslösung zu Eichlösungen mit unterschiedlichen Kon-

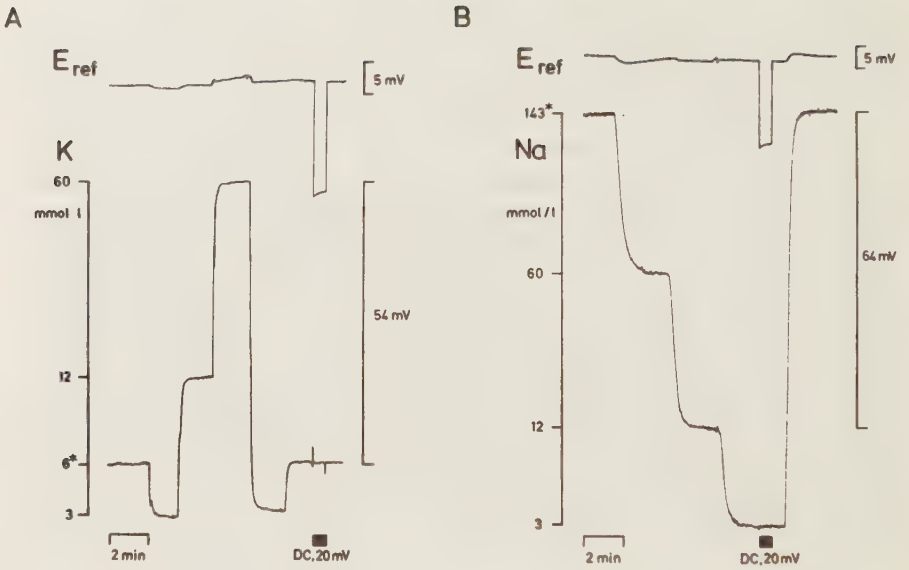

Abb. 3

Eichungen einer K^+- (in A) und einer Na^+-sensitiven (in B) Mikroelektrode. Die Elektroden wurden kontinuierlich mit Eichlösungen unterschiedlicher K^+- bzw. Na^+-Konzentration umspült (Durchflußrate ca. 8 ml/min). Jeder K^+- bzw. Na^+-Konzentration der Eichlösungen entsprach ein bestimmter Spannungssprung in Bezug auf die Krebslösung mit 6 mmol/l K^+ (6*, in A) bzw. 143 mmol/l Na^+ (143*, in B). Die Spannungsschwankungen des Referenzkanals (E_{ref}) der K^+- bzw. Na^+-sensitiven Elektrode um ca. $\pm$2 mV sind durch die unterschiedliche Ionenstärke der Eichlösungen bedingt. Ein DC-Kalibrierungspuls mit einer Amplitude von -20 mV diente zur Überprüfung der Abstimmung der Verstärker. Die geringen Subtraktionsartefakte auf den Ionenspuren zu Beginn und am Ende der DC-Pulse deuten auf eine geringe elektrische Ansprechzeit der Elektroden hin. Die chemische Ansprechzeit scheint aufgrund der Steilheit der jeweiligen Spannungssprünge im unteren Sekundenbereich zu liegen.

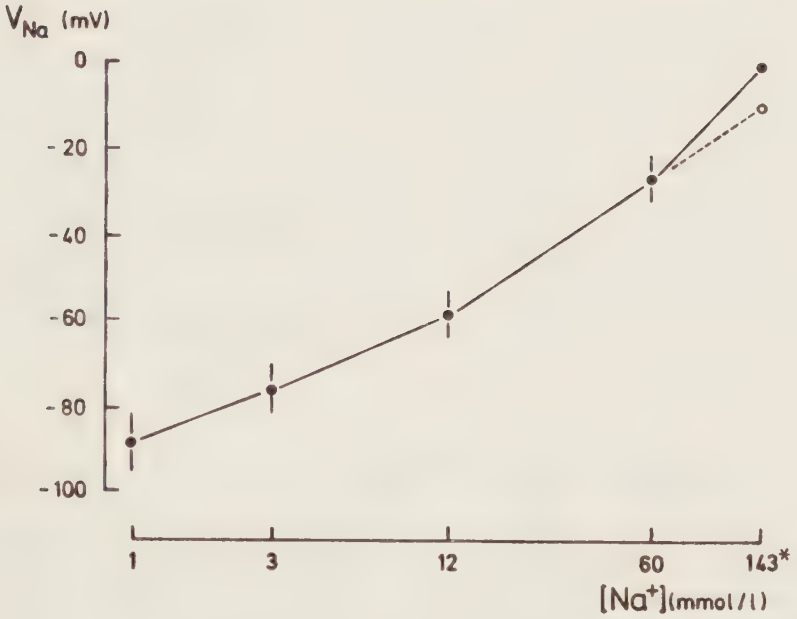

Abb. 4

Eichkurve Na^+-sensitiver doppelläufiger Mikroelektroden. Die Werte der Spannungssprünge (Ordinate) zwischen der Krebslösung mit 143 mmol/l Na^+ (143*) und den Eichlösungen mit den jeweils angegebenen freien Na^+-Konzentrationen (Abszisse) sind die Mittelwerte von 31 Elektroden; die Balken stellen dabei die Größe der Standardabweichungen der jeweiligen Mittelwerte dar. Der extrapolierte Spannungswert (offener Kreis) entspricht etwa dem Ca^{++}-Anteil des Spannungssprungs zwischen der Krebslösung und den Ca^{++}-freien Eichlösungen.

zentrationen an NaCl (1, 3, 12 und 60 mmol/l, bei einem konstanten Hintergrund von 150 mmol/l KCl) auftraten (Abb. 3 B). Die Eichlösungen enthielten im Gegensatz zu der Krebslösung kein Ca^{++}. Dadurch wurde beim Wechsel von der Krebslösung zu den Eichlösungen eine mögliche Beteiligung der unterschiedlichen extra- und intrazellulären Ca^{++}-Konzentration (2.5 mmol/l und ca. 0.1 µmol/l) an E_{ION} annähernd imitiert (s. den extrapolierten Ca^{++}-Anteil bei $E_{ION} = V_{Na}$ in Abb. 4). Obwohl die individuellen Unterschiede der Na^+-ISME nicht sehr groß waren (s. Standardabweichungen in Abb. 4), war es von Vorteil, die intrazelluläre freie Na^+-Konzentration anhand von individuellen Eichkurven zu bestimmen.

2.3.5 Cl^--sensitive Mikroelektroden

Die intrazelluläre freie Cl^--Konzentration wurde mit einem Cl^--sensitiven Ionenaustauscher (IE-170, WP Instruments) bestimmt. Die Elektroden wurden vor und nach den Experimenten sowohl in reinen KCl-Eichlösungen kalibriert (15, 40, 80 und 150 mmol/l, Abb. 5 A, 6) als auch in Eichlösungen konstanter Ionenstärke mit unterschiedlichen KCl-Konzentrationen (1, 10, 40 und 100 mmol/l, mit entsprechenden Konzentrationen von Na^+-Glucuronat als Hintergrund, Abb. 5 B, 6). Die unterschiedlichen Eichlösungen hatten keinen Einfluß auf die Antwortcharakteristik des ionensensitiven Kanals der Elektroden (Abb. 6). Insbesondere scheint die Selektivität des Cl^--Austauschers für Glucuronat gering zu sein. Aus diesem Grund wurde Glucuronat als substituierendes Anion zur Herstellung von Versuchslösungen mit erniedrigter Cl^--Konzentration verwendet. Bei Verwendung des Ag/AgCl-Pellets als Referenzelektrode (s. 2.4.1) traten in Glucuronatlösungen z.T. Gleichspannungsartefakte ("DC-offset") auf, die über den Referenzkanal der ISME registriert wurden (Abb. 5 B). Die Selektivitätskoeffizienten für interferierende Anionen dürften den Werten entsprechen, die von Baumgarten (1981) für den Corning Cl^--Austauscher

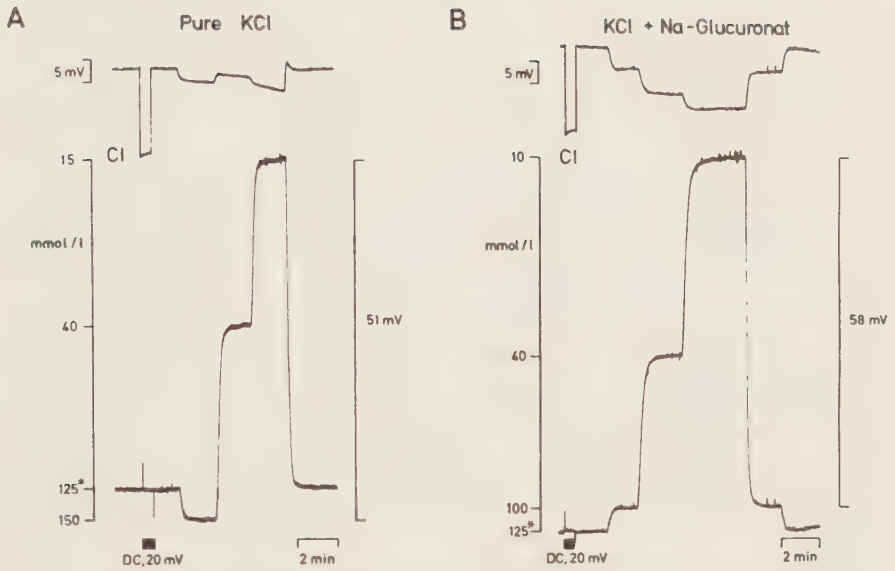

Abb. 5

Eichung von zwei Cl^--sensitiven Mikroelektroden in reinen KCl-Lösungen (in A) und in Lösungen konstanter Ionenstärke mit Na-Glucuronat als Hintergrund (in B). Jeder Cl^--Konzentration der Eichlösungen entspricht ein bestimmter Spannungssprung in Bezug auf die Krebslösung mit 125 mmol/l Cl^- (125*). Die Spannungsschwankungen des Referenzkanals (jeweils obere Spur in A und B) um maximal -5 mV in A sind bedingt durch die unterschiedliche Ionenstärke der Eichlösungen. Bei den Spannungssprüngen um maximal -15 mV in B handelt es sich um ein Glucuronat-Artefakt an der Referenzelektrode. (Beschreibung des Austauschs der Lösungen, der DC-Pulse und der elektrischen bzw. chemischen Ansprechzeiten der Elektroden in Abb. 3.)

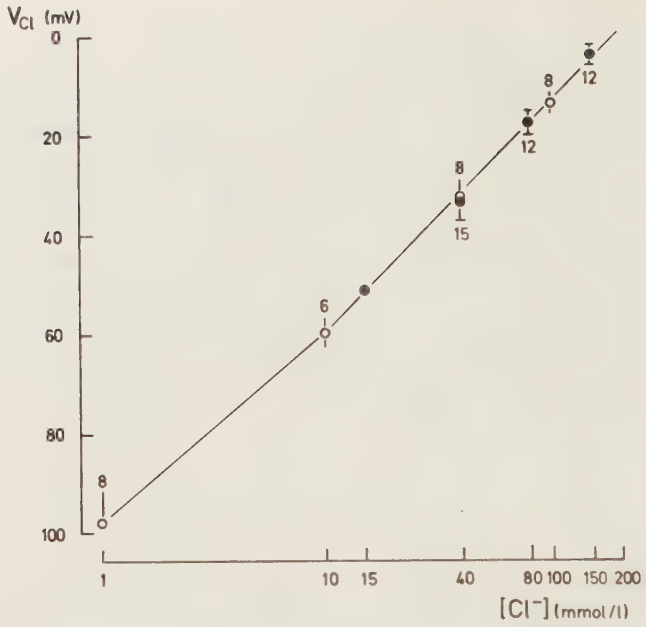

Abb. 6

Eichkurve Cl^--sensitiver Mikroelektroden. Die Symbole stellen die Mittelwerte der Spannungssprünge (Ordinate) zwischen einer reinen KCl-Lösung (15 mmol/l) und reinen KCl-Eichlösungen (gefüllte Kreise) bzw. Eichlösungen mit unterschiedlicher KCl-Konzentration und konstanter Ionenstärke (durch entsprechende Addition von Na-Glucuronat, offene Symbole) dar. Die Balken mit Querbalken geben die Größe der Standardabweichungen der Mittelwerte für die reinen KCl-Lösungen an; die Balken ohne Querbalken entsprechen den Standardabweichungen der Mittelwerte in den Eichlösungen mit Na-Glucuronat. Die Zahlen über den offenen Symbolen geben die Anzahl der in den Glucuronatlösungen gemessenen Elektroden an, die Zahlen unter den geschlossenen Symbolen entsprechen der Anzahl der in reiner KCl-Lösung gemessenen Elektroden. Beachte, daß die Eichgeraden für beide Eichverfahren im Bereich zwischen 10 und 150 mmol/l identisch sind.

(477913) ermittelt wurden, da der verwendete Cl^--Austauscher IE-170 in Bezug auf seine Zusammensetzung mit diesem identisch ist. Dementsprechend beträgt $K^{pot}_{Cl,j}$ für Propionat 0.47, für Bicarbonat 0.04 und für Azetat 0.22. Aufgrund der relativ geringen Selektivität des Cl^--Austauschers gegenüber Azetat wurde ein Teil der Cl^--Messungen mit K-Sulfat als Elektrolytlösung des Referenzkanals der Cl^--ISME durchgeführt (s. auch 2.3.1, 2.4.2 und Tab. 1), um mögliche Beeinflussungen von E_{ION} durch aus der Elektrode diffundierendes Azetat auszuschließen. Aufgrund möglicherweise zusätzlicher Interferenzen mit anderen Anionen werden die Werte für das intrazelluläre Cl^- sowohl als Spannung des Ionensignals (V_{Cl}) als auch als freie intrazelluläre Ionenkonzentration entsprechend den erstellten Eichkurven (Abb. 6) angegeben (Abb. 11, 20, 21). Die Steigungen der Cl^--Elektroden lagen zwischen 44 und 58 mV/zehnfache Änderung der freien Cl^-Konzentration (50.0 $\pm$ 3.0; Mittelwert $\pm$ Standardabweichung, n= 25). Die Bestimmung der freien intrazellulären Cl^--Konzentration entsprach methodisch der Bestimmung der freien intrazellulären Na^+-Konzentration.

2.4 Elektrische Stimulation und Ableitung

2.4.1 Extrazellulär

Über die präganglionäre Saugelektrode konnten die präganglionären Nervenfasern des Ganglions durch Rechteck-Spannungspulse (≤50 V, 0.1 ms) stimuliert werden. Die Stimulation löste exzitatorische postsynaptische Potentiale (EPSP) und synaptische Aktionspotentiale bei überschwelliger Reizung aus. Der elektrophysiologische Zustand der Ganglien wurde durch Registrierung des extrazellulären, biphasischen Summenaktionspotentials über die postganglionäre Saugelektrode überprüft. Diese Summenantwort der postganglionären Nervenfasern ließ sich nach 100-facher Verstärkung (Differenzverstärker System 75, AMI) auf einem Zweifachstrahl-Speicheroszilloskop (Tektronix 5113) abbilden. Ein Summenaktionspotential mit einer Amplitude von 6 bis 8 mV war für die Ganglien typisch. Dabei war zu berücksichtigen, daß die Größe der Summenantwort u.a. vom Widerstand über der Saugelektrode abhing.

Als Referenzelektrode für die extra- und intrazellulären Ableitungen dienten ein Ag/AgCl-Pellet bzw. eine Glaskapillare, gefüllt mit 2%Agar agar in 3 mol/l KCl.

2.4.2 Intrazellulär

Die Zellen wurden mit Hilfe eines Piezokristall-getriebenen Schrittmotors (Frankenberg PM 500-20, München), der über ein stereotaktisches Gerät positioniert werden konnte, punktiert. Die Mehrzahl der erfolgreichen Einstiche gelang durch kurzzeitige Überkompensation der Kapazitätskompensation des Spannungssignals für die Membranpotentialregistrierung.

Für die intrazellulären Registrierungen mit Einzelelektroden (konventionelle Ableittechnik) wurden Kapillaren aus Borosilikatglas mit Filament (äußerer/innerer Durchmesser: 1.5/0.875 mm; Hilgenberg, Malsfeld) mit Hilfe eines horizontalen Elektrodenziehgerätes (Brown & Flaming, 1977) auf einen Spitzendurchmesser vermutlich unter 0.1 µm gezogen. Die Widerstände dieser Elektroden, in Krebslösung mittels DC-Strominjektion gemessen, lagen in Abhängigkeit von der Elektrolyt-Füllösung (4 mol/l K-Azetat bzw. 1 mol/l Mg-Azetat) zwischen 40 und 80 bzw. 70 und 110 MΩ. Das gemessene Membranpotential wurde durch einen Einzelelektroden Spannungsklemmverstärker (Dagan 8100) 10-fach verstärkt und auf dem Speicheroszilloskop abgebildet. Mit Hilfe dieses Verstärkers war es möglich, den Membranwiderstand der Zellen durch Injektion von Strompulsen zu messen bzw. Aktionspotentiale auszulösen. Der injizierte Strom ließ sich ebenfalls auf dem Oszilloskop abbilden.

Die Widerstände des mit Elektrolytlösung (4 mol/l K-Azetat, 1 mol/l Mg-Azetat bzw. 0.5 mol/l Mg- oder K-Sulfat) gefüllten Referenzkanals der ISME, in Krebslösung gemessen, lagen in Abhängigkeit von der verwendeten Elektrolytlösung zwischen 60 und 180 MΩ. Die Widerstände des mit Flüssig-Ionenaustauscher gefüllten Kanals der ISME lagen in Abhängigkeit vom jeweils verwendeten Austauscher zwischen 10^3 und 10^5 MΩ. Der Referenzkanal und der ionensensitive Kanal wurden an hochohmige, kapazitätskompensierbare Verstärker angeschlossen. Die Ausgangsspannungen dieser Verstärker konnten getrennt registriert werden. Beide Spannungen fielen zusätzlich an den Eingängen eines Differenzverstärkers ab. Dieser Differenzverstärker diente zur Subtraktion von Spannungsänderungen am Referenzkanal von Spannungsänderungen am ionensensitiven Kanal. Damit konnte das eigentliche Ionensignal als Spannungsabfall am Ausgang des Differenzverstärkers bestimmt werden (Abb. 1).

Eine Kalibrierungsbox zur Applikation von DC-Spannungspulsen variabler Amplitude und Polarität zwischen Bad und Haupterde ermöglichte eine genaue Abstimmung der Verstärker ("gain-adjustment"). Durch entsprechende DC-Pulse (z.B. 20 mV, 30 s) konnte außerdem die elektrische Ansprechzeit der Elektroden anhand der Zeitkonstante des Subtraktionsartefaktes des Signals am Ausgang des Differenzverstärkers abgeschätzt und durch Kompensation der Elektrodenkapazität verringert werden. Die Zeitkonstanten der elektrischen und chemischen Ansprechzeiten lagen trotz der geringen Spitzendurchmesser der ISME für alle verwendeten Austauscher in der Regel im unteren Sekundenbereich (Abb. 3, 5, 9).

2.5 Registrierung und Speicherung der Daten

Schnelle Ereignisse, wie Aktionspotentiale, wurden auf dem Speicheroszilloskop (s. 2.4.1) abgebildet und mit einer Sofortbildkamera abfotografiert. Zur langsamen Registrierung von Membranpotential und Ionensignal diente ein 6-Kanal Linienschreiber (W+W electronic AG 316). Die zeitliche Auflösung war durch den Frequenzgang dieses Gerätes limitiert; dieser betrug 1.5 Hz für die volle Papierbreite von 29 cm. Die Daten wurden mit einem 4-Kanal Magnetbandgerät (Hewlett-Packard HP 3964 A) aufgezeichnet, so daß Abbildungen durch das Abspielen gespeicherter Daten erstellt werden konnten.

3 Ergebnisse

3.1 Allgemeine Beobachtungen

Nach der Punktierung eines Neurons des Cervicalganglions der Ratte mit einer doppelläufigen ionensensitiven Mikroelektrode (Spitzendurchmesser $\leq$ 0.3 µm) verging in der Regel eine Zeit von 5 bis 10 Minuten, bis die intrazellulären Ionenkonzentrationen ($[K^+]_i$, $[Na^+]_i$ bzw. $[Cl^-]_i$) und das Membranpotential einen zeitlich konstanten Wert ("steady-state") erreichten. Während dieser Zeit folgte z.B. auf einen initialen Anstieg der intrazellulären Na^+-Konzentration oder einen Abfall der intrazellulären K^+-Konzentration ein Abfall der intrazellulären Na^+-Konzentration oder entsprechend ein Anstieg des intrazellulären K^+. $[Cl^-]_i$ war entweder zeitlich konstant oder nahm im Verlauf dieser "Einheilungsphase" etwas ab. Die Ionenverschiebungen waren von einer Membranhyperpolarisation begleitet. Dieses Verhalten zeigt vermutlich an, daß 5 bis 10 Minuten nötig waren, um die intrazellulären Ionenkonzentrationsveränderungen, die durch die Membranschädigung während des Einstichs verursacht worden waren, zu überwinden.

Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die Werte von Ruhemembranpotential, Aktionspotentialamplitude und die Basiswerte der jeweiligen Ionenkonzentrationen, gemessen nach der Einheilungsphase der Elektroden. Aus den gemittelten Basiswerten für die intrazellulären Ionenkonzentrationen ($[K^+]_i$ = 129.7 mmol/l, $[Na^+]_i$ = 7.7 mmol/l und $[Cl^-]_i$ = 41.5 mmol/l bzw. 40.4) ergaben sich unter Miteinbeziehung der extrazellulären Ionenkonzentrationen entsprechend der Nernst-Beziehung folgende Gleichgewichtspotentiale: E_K = -80 mV, E_{Na} = +76 mV und E_{Cl} = -27 mV. Bei einem für die K^+-, Na^+- und Cl^--Messungen durchschnittlichen Ruhemembranpotential zwischen -46.8 und -50.1 mV betrug die treibende Kraft für K^+ ca. 30 mV, für Na^+ ca. 120 mV und für Cl^- ca. 20 mV. Als Kontrolle über die Qualität des Einstichs diente die Ampli-

Tabelle 1

Freie intrazelluläre Ionenkonzentrationen und Membranpotentiale von Neuronen im Ganglion cervicale superius der Ratte (Ruhemembranpotential für alle Messungen $\geq$ -40 mV; alle Werte sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichungen).

ION	K^+	Na^+	Cl^-
Ruhemembran-potential (mV)	-50.1 $\pm$ 7.6	-47.3 $\pm$ 5.8	-46.8 $\pm$ 5.3* -49.1 $\pm$ 5.4**
Aktionspoten-tialamplitude (mV)	82.9 $\pm$ 15.8	76.7 $\pm$ 13.0	81.7 $\pm$ 13.0* 91.8 $\pm$ 14.1**
Basiswert der Ionenkonzentra-tion (mmol/l)	129.7 $\pm$ 12.9	7.7 $\pm$ 3.3	41.5 $\pm$ 9.0* 40.4 $\pm$ 6.0**
E_{ION} (mV)	-80	+76	-27
Anzahl der Beobachtungen	48	22	15* 39**

Bei den Cl^--Messungen:

* 1 mol/l K-Azetat

** 0.5 mol/l K-Sulfat

} als Elektrolytlösung des Referenzkanales der ISME

tude der synaptisch ausgelösten Aktionspotentiale. Die Aktionspotentialamplituden, die für die jeweiligen Ionenmessungen im Mittel zwischen 76.7 und 91.8 mV lagen, waren durchaus mit denen bei Ableitung mit Einzelelektroden vergleichbar (vergl. Adams & Brown, 1975). Im allgemeinen war es möglich, von solchen Neuronen länger als eine Stunde ohne eine Verschlechterung von Ruhemembranpotential und Aktionspotential abzuleiten. Die im Vergleich zu einem veröffentlichten vorläufigen Bericht (Ballanyi et al., 1983) höheren Tabellenwerte für Ruhemembranpotential und Aktionspotentialamplitude bei den K^+- und Na^+-Messungen sind bedingt durch eine verbesserte Einstichtechnik und feinere Elektrodenspitzen. Diese Verbesserungen äußern sich auch in den entsprechend höheren K^+- bzw. niedrigeren Na^+-Basiswerten in der vorliegenden Arbeit.

3.2 Repetitive Stimulation

Repetitive Stimulation des präganglionären Nerven (z.B. 30 Hz, 20 s) resultierte in einer Membrandepolarisation von etwa 20 mV, die in der Regel von einer beträchtlichen post-tetanischen Hyperpolarisation gefolgt wurde. Aufgrund dieser Stimulation konnten vorübergehende Anstiege des intrazellulären Na^+ und entsprechende Abfälle des intrazellulären K^+ beobachtet werden. Die stimulationsbedingten Na^+- und K^+-Verschiebungen waren allerdings gering und lagen im Bereich von 1 bis 5 mmol/l (Abb. 7). Die Kinetik der Na^+- und K^+-Bewegungen entsprach der Kinetik vergleichbarer intrazellulärer Ionenverschiebungen bei Motoneuronen des Frosches (Grafe et al., 1982).

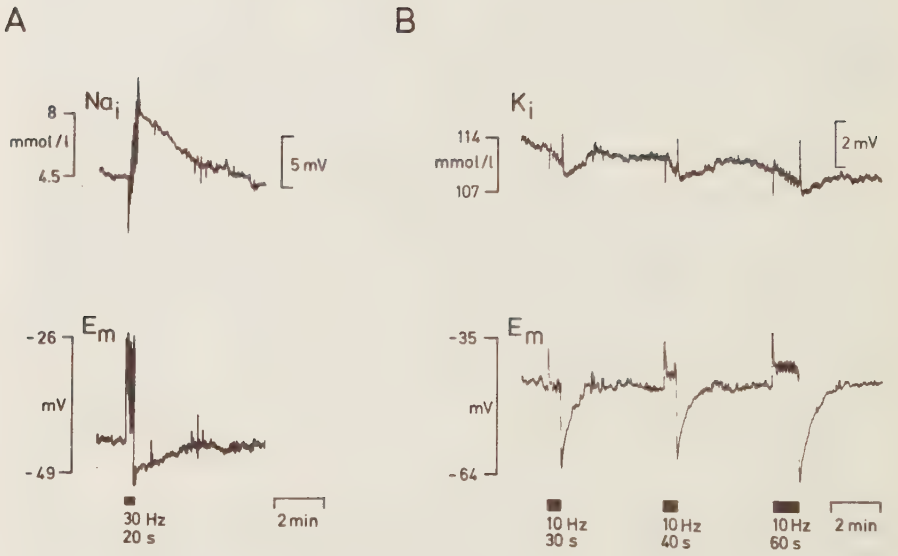

Abb. 7

Effekte von repetitiver Stimulation auf die freien intrazellulären Konzentrationen von Na^+ (Na_i, in A) und K^+ (K_i, in B) bzw. Membranpotential (E_m) von sympathischen Neuronen der Ratte. Elektrische Stimulation der präganglionären Nervenfasern führt zu einer Membrandepolarisation aufgrund synaptischer Aktivität, gefolgt von einer post-tetanischen Hyperpolarisation. Bei Stimulation mit 30 Hz (20 s) wurde Na_i vorübergehend von 4.5 auf 8 mmol/l erhöht (in A). Unterschiedlich lange Reizung (30, 40 und 60 s) mit 10 Hz resultierte jeweils in einem kurzzeitigen Abfall der K_i (in B).

3.3. Ionenbewegungen bei Rezeptoraktivierung

3.3.1 Effekte von Carbachol

Applikation des Acetylcholin-Agonisten Carbachol resultierte in einer Membrandepolarisation, die in der Regel von einer Hyperpolarisation gefolgt wurde. Die Amplitude der Depolarisation war abhängig sowohl von der Carbacholkonzentration als auch von der Dauer der Applikation. 50 µmol/l Carbachol, gegeben für 45 s, führte im Mittel zu einer Depolarisation auf einen Membranpotentialwert von -23.6 ± 4.0 mV (Mittelwert ± Standardabweichung, n = 11), während bei einer Applikationsdauer von 1 min die Membran auf einen Wert von -18.0 ± 3.4 mV (Mittelwert ± Standardabweichung, n = 8) depolarisierte. Diese Werte für das Spitzenpotential der Carbachol-Depolarisation stimmen recht gut mit dem geschätzten Wert für das Carbachol-Umkehrpotential bei parasympathischen Rattenganglienzellen (-20 mV) überein (Ascher et al., 1979). Die intrazellulären Messungen bestätigen bisherige Daten, die mit extrazellulären Ableittechniken erhalten wurden (Brown et al., 1972).

Die Membranpotentialveränderungen waren von vorübergehenden Abfällen der intrazellulären K^+-Konzentration um 7 bis 40 mmol/l und entsprechenden Anstiegen der intrazellulären Na^+-Konzentration begleitet. Abb. 8 illustriert die Membranpotentialveränderungen und intrazellulären K^+-Verschiebungen nach Bad-Applikation von 50 µmol/l Carbachol (45 s). Während der ersten Applikation von Carbachol wurde die Membran auf -20 mV depolarisiert. Die Repolarisation der Membran wurde gefolgt von einer Hyperpolarisation auf -67 mV, bevor das Membranpotential auf seinen Ruhewert von -60 mV zurückkehrte. Die intrazelluläre K^+-Konzentration nahm von 144 auf 116 mmol/l ab. Auf diesen Abfall um 28 mmol/l folgte eine Wiederaufnahme von K^+ in die Zelle. Die Basislinie wurde ca. 8 min nach dem Beginn der Netto-Wiederaufnahme des K^+ erreicht. Nach der zweiten Applikation von Carbachol wurde

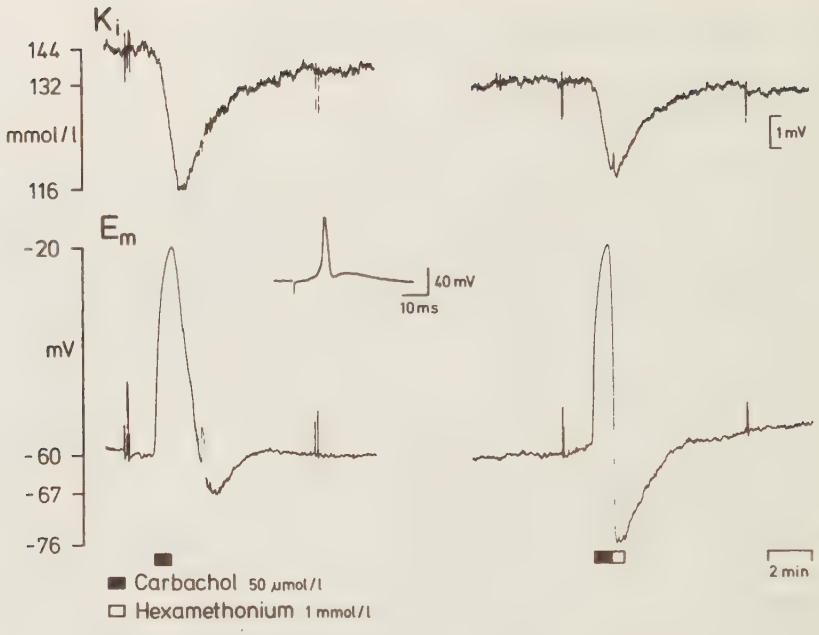

Abb. 8

Effekte von Carbachol auf die freie intrazelluläre K^+-Konzentration (K_i) und das Membranpotential (E_m) bei einem sympathischen Neuron der Ratte. Die Veränderungen des Membranpotentials nach Bad-Applikation von Carbachol waren begleitet von vorübergehenden Abfällen der K_i. Hexamethonium wurde nach der zweiten Carbachol-Applikation zur Blockierung der nikotinischen Rezeptoren addiert. Beachte, daß die post-Carbachol Hyperpolarisation in der Anwesenheit von Hexamethonium ausgeprägter ist. Außerdem ist der Abfall der K_i aufgrund einer schnelleren Repolarisation der Membran in Anwesenheit von Hexamethonium kleiner. Das Zeitintervall zwischen den beiden Messungen betrug ca. 15 min. Die kurzzeitigen Ablenkungen auf beiden Spuren sind durch elektrisch ausgelöste Aktionspotentiale bedingt. Der Einsatz zeigt ein synaptisch ausgelöstes Aktionspotential dieser Zelle mit einer Amplitude von 95 mV.

Hexamethonium, ein Acetylcholin-Antagonist benutzt, um die nikotinischen Rezeptoren zu blockieren (Brown et al., 1972). Dieses experimentelle Verfahren beschleunigte die post-Carbachol Repolarisation. Die beobachtete Hyperpolarisation in Anwesenheit von Hexamethonium war im Vergleich zur Kontrolle um 9 mV größer. In Übereinstimmung mit der kürzeren Periode der Membrandepolarisation betrug der Abfall des intrazellulären K^+ lediglich 14 mmol/l, d.h. $[K^+]_i$ fiel von 132 auf 118 mmol/l ab. Die Kinetik der frühen Phase der K^+-Wiederaufnahme war in Anwesenheit von Hexamethonium leicht verändert, was mit den Daten von Scholfield (1977) übereinstimmt, der $^{42}K^+$- bzw. $^{86}Rb^+$-Fluxe nach Superfusion von Cervicalganglien der Ratte mit Carbachol gemessen hat. Entsprechend war in Anwesenheit von Hexamethonium die Kinetik der Na^+-Extrusion nach Carbachol verändert (vergl. Abb. 9, 10, 16).

Die Effekte von Carbachol auf das intrazelluläre Na^+ waren den Effekten auf das intrazelluläre K^+ entgegengesetzt. Abb. 9 zeigt die Wirkung von Carbachol auf $[Na^+]_i$ bei einer Zelle mit einem Ruhemembranpotential, welches vergleichbar ist mit dem Ruhemembranpotential der K^+-Messung in Abb. 8. Bei Applikation von 100 µmol/l Carbachol (45 s) depolarisierte die Membran auf -15 mV. Diese Depolarisation war begleitet von einem $[Na^+]_i$-Anstieg um ca. 20 mmol/l. Der anfängliche Abfall der $[Na^+]_i$ vor der ersten Carbachol-Applikation ist vermutlich auf eine vorausgegangene Zellverbesserung zurückzuführen (s. 3.1). Für die zweite Applikation wurde 50 µmol/l Carbachol verwendet. Dies resultierte in einer kleineren Membrandepolarisation und einem entsprechend kleineren Anstieg der $[Na^+]_i$.

Die Wirkung von Carbachol wurde ebenfalls auf die freie intrazelluläre Cl^--Konzentration ($[Cl^-]_i$) untersucht. Bei solchen Experimenten zeigte sich im Gegensatz zu den Veränderungen der $[K^+]_i$ und $[Na^+]_i$ keine Carbachol-induzierte Veränderung der $[Cl^-]_i$ (Abb. 11).

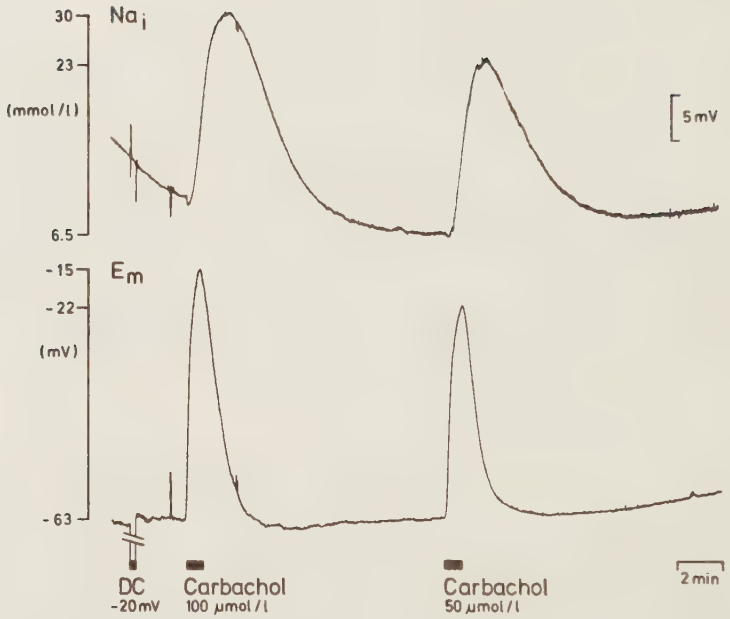

Abb. 9

Effekte von Carbachol auf die freie intrazelluläre Na^+-Konzentration (Na_i) und das Membranpotential eines sympathischen Neurons der Ratte. Die Depolarisation nach Bad-Applikation von 100 µmol/l Carbachol war von einem beträchtlichen Anstieg der Na_i begleitet. 50 µmol/l Carbachol führte zu einer kleineren Depolarisation und zu einem geringeren Anstieg der Na_i. Der anfängliche Na_i-Abfall ist auf eine Zellverbesserung zurückzuführen. Ein DC-Puls (-20 mV) wurde zwischen Bad und Haupterde angelegt, um die Abstimmung der Verstärker zu überprüfen.

In einigen Experimenten wurden Tetrodotoxin (TTX), eine Substanz, die selektiv spannungsabhängige Na^+-Kanäle blockiert, und Veratridine, welches selektiv spannungsabhängige Na^+-Kanäle aktiviert, verwendet, um den Ursprung des Carbachol-induzierten Na^+-Anstiegs zu charakterisieren. Abb. 10 zeigt, daß Veratridine (60 µmol/l, 30 s) ähnliche Effekte auf Membranpotential und $[Na^+]_i$ hat wie Carbachol. Eine Membrandepolarisation auf -21 mV wurde gefolgt von einer post-Veratridine Hyperpolarisation auf -73 mV. $[Na^+]_i$ stieg von 4 auf 50 mmol/l an und kehrte nach 9 min auf den Ruhewert von 4 mmol/l zurück. Applikation von Carbachol (50 µmol/l, 45 s) bei der gleichen Zelle führte ebenfalls zu einem typischen Anstieg der $[Na^+]_i$ (s.o.). Wenige Minuten nach Superfusion des Ganglions mit TTX jedoch war die Veratridine-Antwort vollständig blockiert, während die Membranpotentialveränderung und der $[Na^+]_i$-Anstieg bei Carbachol unbeeinträchtigt waren. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Carbachol-induzierten $[Na^+]_i$-Anstiege durch einen Na^+-Einstrom aufgrund der Aktivierung von Rezeptor-gekoppelten Na^+-Kanälen und nicht von spannungsabhängigen Na^+-Kanälen bedingt sind (Narahashi, 1974).

3.3.2 Effekte von GABA

Applikation von γ-Aminobuttersäure (GABA) führt zu einer Membrandepolarisation bei isolierten sympathischen Ganglienzellen der Ratte (Bowery & Brown, 1974; Adams & Brown, 1975). Die Amplitude der GABA-Depolarisation, über den Referenzkanal der ionensensitiven Mikroelektrode gemessen, konnte bei Zellen mit einem Ruhemembranpotential von mehr als -60 mV einen Wert von über 40 mV annehmen. Das mittlere Spitzenpotential dieser Membrandepolarisation bei Applikation von 100 µmol/l GABA (45 s) betrug -24.2 $\pm$ 4.6 mV (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung, n = 25). Die Membran repolarisierte im Anschluß an diese Depolarisation sehr rasch. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um den Effekt

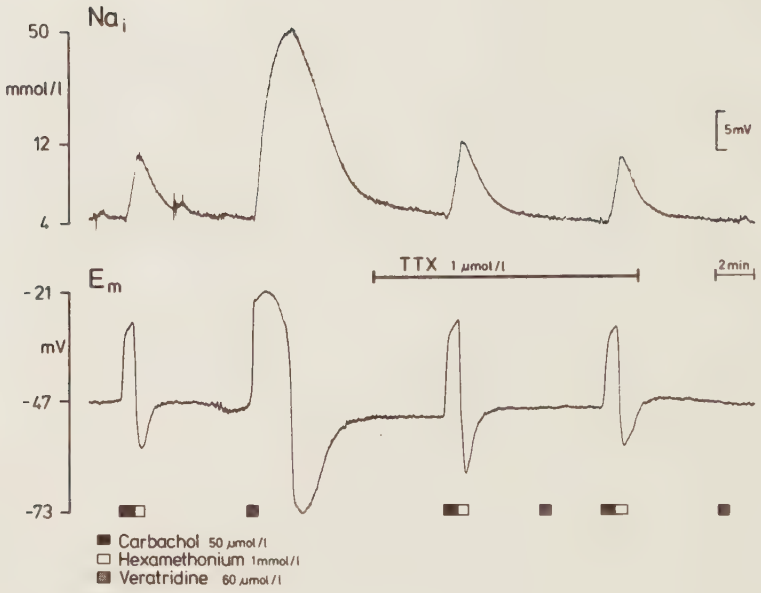

Abb. 10

Effekte von Carbachol und Veratridine auf die intrazelluläre Na^+-Konzentration (Na_i) und das Membranpotential (E_m) in Anwesenheit von Tetrodotoxin (TTX). Die Substanzen wurden der Superfusionsflüssigkeit zugefügt. Beachte, daß die Effekte von Veratridine und Carbachol auf Membranpotential und Na_i trotz unterschiedlicher Amplituden sehr ähnlich waren. In der Anwesenheit von TTX war die Carbachol-Antwort unbeeinflußt, wohingegen die Veratridine-Antwort vollkommen blockiert war.

einer Rezeptordesensitivierung (Gallagher et al., 1983).

Die Experimente mit den Cl^--sensitiven Mikroelektroden zeigten, daß der Basiswert der intrazellulären Cl^--Konzentration mit ca. 41 mmol/l (s. Tab. 1) höher ist als bei einer passiven Verteilung des Cl^- zu erwarten wäre. Diese Daten bestätigen daher bisherige Annahmen über $[Cl^-]_i$ bei sympathischen Säugetierneuronen (Adams & Brown, 1975). Bei allen untersuchten Zellen (n = 54) verursachte GABA einen typischen Abfall der $[Cl^-]_i$ um 4 bis 16 mmol/l, während Carbachol trotz größerer und länger dauernder Depolarisationen keinen Effekt auf $[Cl^-]_i$ hatte (s. 3.3.1 und Abb. 11).

Die intrazelluläre K^+-Konzentration fiel unter GABA in Abhängigkeit von der Größe der Depolarisation vorübergehend um 4 bis 20 mmol/l ab. Abb. 12 illustriert ein typisches Beispiel einer simultanen Messung von Membranpotential und $[K^+]_i$ bei Applikation von 50 µmol/l GABA (45 s), kombiniert mit den entsprechenden Messungen der $[K^+]_e$ und dem Membranpotential einer Gliazelle (in anderen Ganglien). Die Membrandepolarisation um 25 mV war von einem $[K^+]_i$-Abfall um ca. 7 mmol/l für jede der beiden GABA-Applikationen begleitet. Zur gleichen Zeit stieg $[K^+]_e$ von 6 auf 7 mmol/l an. In der Regel betrugen die GABA-induzierten Anstiege der $[K^+]_e$ 1-2 mmol/l (vergl. Förstl et al., 1982). Die Zeitverläufe des intrazellulären K^+-Abfalls und des extrazellulären K^+-Anstiegs waren einander sehr ähnlich und unterschieden sich von den Carbachol-induzierten extra- und intrazellulären K^+-Veränderungen (vergl. Abb. 8, 18).

Eine GABA-induzierte Freisetzung von K^+ in den Extrazellulärraum wird durch intrazelluläre Ableitungen von elektrisch nicht erregbaren Zellen (vermutlich Gliazellen) bekräftigt. Die Gliazellen hatten im Vergleich zu den Neuronen des Cervicalganglions ein höheres Ruhemembranpotential ($\geq$ -65 mV) und einen sehr niedrigen Eingangswiderstand. Weder durch Injektion von depola-

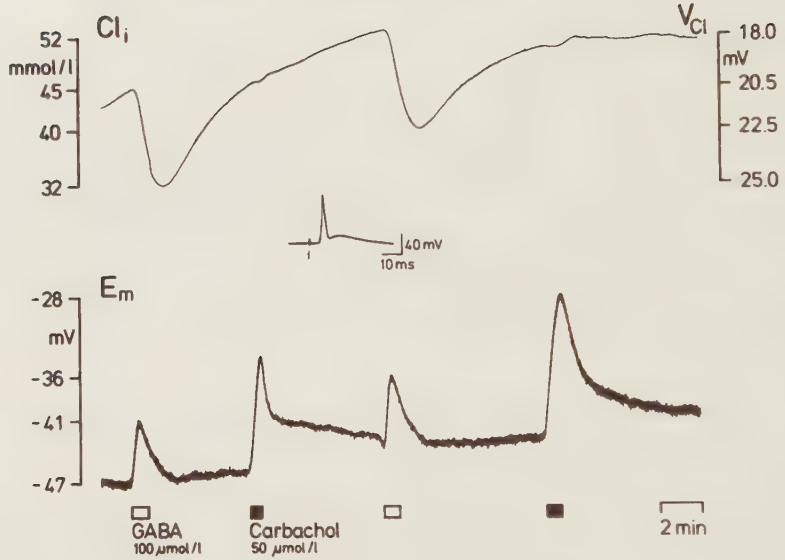

Abb. 11

Effekte von Carbachol und GABA auf die freie intrazelluläre Cl^--Konzentration (Cl_i) und das Membranpotential (E_m) bei einem sympathischen Neuron der Ratte. Die Membrandepolarisation durch GABA ist von einem vorübergehenden Abfall der Cl_i von 45 auf 32 mmol/l begleitet. Die Vergrößerung der Amplitude der Depolarisation bei der zweiten Applikation von GABA ist durch einen Anstieg der Cl_i von 45 auf 52 mmol/l bedingt. Nach Applikation von Carbachol konnte trotz größerer Membrandepolarisationen keine Veränderung der Cl_i beobachtet werden. Der Einsatz zeigt ein synaptisch ausgelöstes Aktionspotential dieser Zelle mit einer Amplitude von ca. 90 mV. Die Ionenspur wurde zur Beseitigung des Elektroden-Rauschens aufgrund von Spontanaktivität der Zelle gefiltert (Tiefpaß, 0.1 Hz).

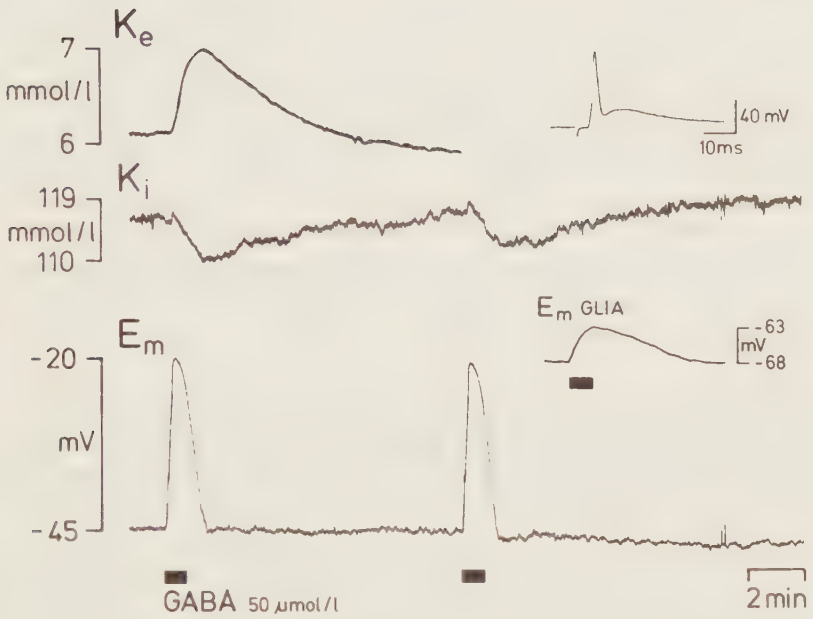

Abb. 12

Effekte von GABA auf die extra- bzw. die intrazelluläre freie K^+-Konzentration (K_e, K_i) und das Membranpotential (E_m) eines Neurons und einer Gliazelle. Die Depolarisationen um etwa 25 mV nach Bad-Applikation von GABA wurden von vorübergehenden Abfällen der K_i um etwa 6 mmol/l begleitet. Zusätzlich erhöhte sich K_e von 6 auf 7 mmol/l. Beachte, daß die Kinetik der Veränderungen der K_e und K_i unter GABA einander sehr ähnlich sind. Der obere Einsatz zeigt ein Aktionspotential des Neurons mit einer Amplitude von 95 mV, elektrisch ausgelöst 8 min nach der zweiten GABA-Applikation. Der untere Einsatz illustriert, daß Gliazellen in der Anwesenheit von GABA ebenfalls depolarisieren (Ableitung aus einem anderen Ganglion).

risierenden Konstantströmen noch durch Reizung des präganglionären Nerven ließen sich EPSPs oder Aktionspotentiale auslösen. Repetitive Stimulation jedoch führte zur Depolarisation der Gliazellen aufgrund der neuronalen K^+-Freisetzung in den Extrazellulärraum. Ein typisches Beispiel der GABA-Wirkung auf eine Gliazelle zeigt der untere Einsatz in Abb. 12. Die Membran dieser Gliazelle wurde unter GABA von -68 auf -63 mV depolarisiert. Unter der Annahme, daß sich die Gliazellmembran wie eine K^+--Elektrode verhält, erhöht sich bei einer derartigen Depolarisation um 5 mV entsprechend der Nernst-Gleichung die extrazelluläre K^+-Konzentration um etwa 1 mmol/l.

Im Gegensatz zu den beobachteten Veränderungen der $[Cl^-]_i$, $[K^+]_i$ und $[K^+]_e$ konnten keine Veränderungen der $[Na^+]_i$ unter GABA festgestellt werden. Abb. 13 zeigt ein Neuron, bei dem aufeinanderfolgende Superfusionen von Carbachol (50 µmol/l, 60 s) und GABA (100 µmol/l, 45 s) zu Membrandepolarisationen zwischen 20 und 25 mV führten. Im Gegensatz zu den typischen Carbachol-induzierten $[Na^+]_i$-Anstiegen war kein Effekt von GABA auf $[Na^+]_i$ festzustellen. Der Abfall der $[Na^+]_i$ zu Beginn der Messungen ist wiederum vermutlich auf eine "Einheilungsphase" der Zelle zurückzuführen.

3.3.3 Vergleich der Effekte von Carbachol und GABA

Die Ergebnisse unter 3.3.1 und 3.3.2 zeigen, daß Carbachol und GABA unterschiedliche Effekte auf das Membranpotential und die freien intrazellulären Konzentrationen von Na^+, K^+ und Cl^- bzw. die freie extrazelluläre K^+-Konzentration haben. Diese Effekte sind in der Abb. 14 zusammenfassend gegenübergestellt. Beide Substanzen depolarisieren die Neurone des Cervicalganglions der Ratte. Im Anschluß an die Carbachol-Depolarisation kam es in der Regel zu einer Membranhyperpolarisation (Abb. 14 A), die bei Auswaschen dieses Acetylcholin-Agonisten

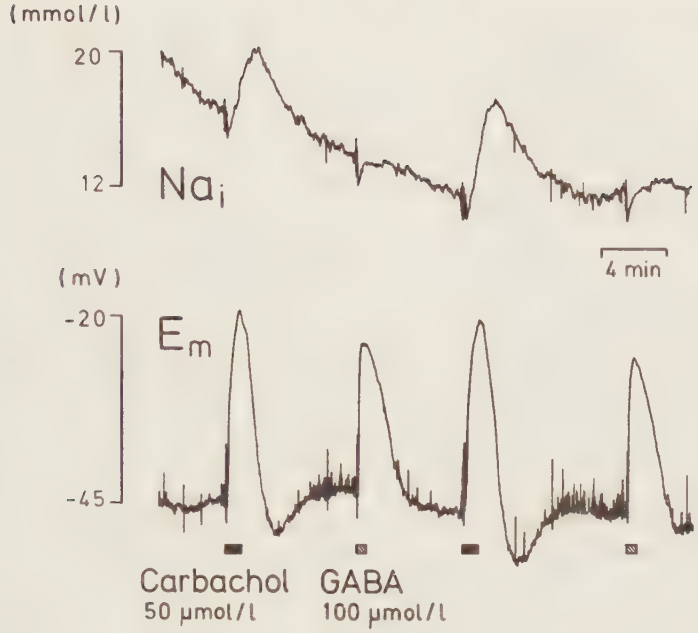

Abb. 13

Effekte von Carbachol und GABA auf die freie intrazelluläre Na^+-Konzentration (Na_i) und das Membranpotential (E_m) eines sympathischen Neurons. Applikation von Carbachol resultierte in der typischen Membrandepolarisation und einem Na_i-Anstieg. GABA jedoch hat trotz einer mit Carbachol vergleichbaren Membrandepolarisation keinen Effekt auf die Na_i. Der Abfall der Na_i vor und nach der ersten Carbachol-Applikation ist zurückzuführen auf eine "Einheilungsphase" der Zelle. Das Rauschen auf der Na_i- und der E_m-Spur ist teilweise bedingt durch Spontanaktivität des Neurons. Bei den kurzzeitigen "Na_i-Abfällen" zu Beginn der Carbachol- bzw. GABA-Depolarisationen handelt es sich um Subtraktionsartefakte aufgrund schlechter Kompensation des Ionensignals (vergl. Abb. 3).

mit Hexamethonium verstärkt wurde (s. Abb. 8,16). Im Gegensatz dazu wurde in keinem Fall eine Hyperpolarisation im Anschluß an die GABA-Depolarisation beobachtet. Sowohl Carbachol als auch GABA führten zu einem vorübergehenden Abfall der $[K^+]_i$ und entsprechend zu einem Anstieg der $[K^+]_e$. Dabei war die Kinetik der intra- und extrazellulären K^+-Bewegungen für Carbachol und GABA unterschiedlich (s. z.B. den $[K^+]_e$-undershoot in Abb. 14 A). Unter Carbachol trat ein $[Na^+]_i$-Anstieg auf, der dem $[K^+]_i$-Abfall in Bezug auf seine Amplitude vergleichbar war. Im Gegensatz dazu war der $[K^+]_i$-Abfall unter GABA von einem entspechenden $[Cl^-]_i$-Abfall begleitet. Bei Carbachol war hingegen keine Veränderung der $[Cl^-]_i$ festzustellen, während bei GABA keine Veränderung der $[Na^+]_i$ gemessen werden konnte (beide Beobachtungen in Abb. 14 nicht dargestellt). Die maximalen Werte für die Verschiebungen der $[Na^+]_i$ und der $[K^+]_i$ unter Carbachol liegen etwa zu Beginn der Repolarisationsphase der Membran und korrelieren zeitlich mit dem maximalen Wert des Anstiegs der $[K^+]_e$. Im Gegensatz dazu war das Membranpotential im Anschluß an GABA in der Regel auf seinen Ruhewert zurückgekehrt, wenn der Abfall der $[K^+]_i$ bzw. der $[Cl^-]_i$ seinen maximalen Wert erreichte. Zum Zeitpunkt der maximalen Hyperpolarisation der Membran nach Carbachol ist weder $[Na^+]_i$ noch $[K^+]_i$ auf ihren Ausgangswert zurückgekehrt. Das Membranpotential, $[Na^+]_i$ und $[K^+]_i$ erreichen ihre Ruhewerte bei Ende des $[K^+]_e$-undershoot, welcher mit der post- Carbachol Hyperpolarisation korreliert (vergl. Abb. 15,16).

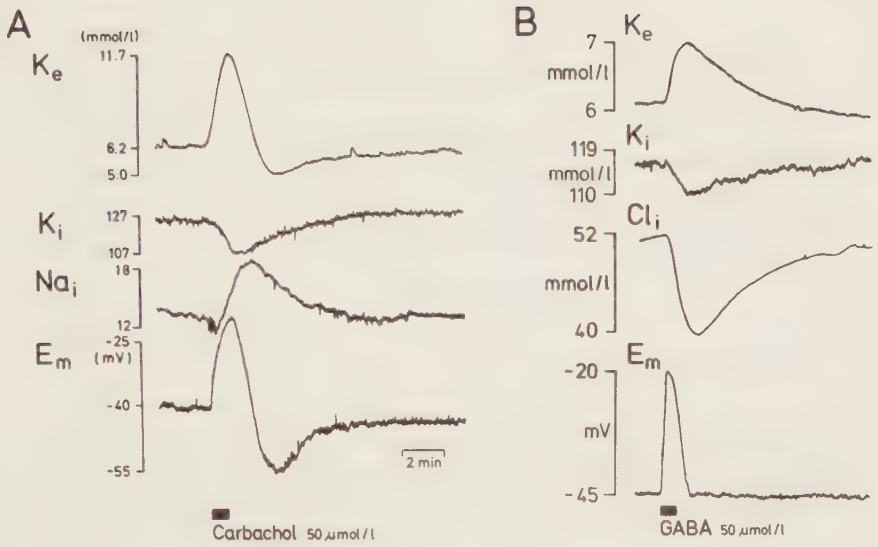

Abb. 14

Zusammenfassende Darstellung der Ionenbewegungen nach Bad-Applikation der Rezeptor-Agonisten Carbachol (in A) und GABA (in B) bei sympathischen Neuronen der Ratte. A: Applikation von Carbachol resultiert in einer Membrandepolarisation um ca. 20 mV, die von einem kurzzeitigen Anstieg der $[Na^+]_i$ (Na_i) bzw. der $[K^+]_e$ (K_e) und einem Abfall der $[K^+]_i$ (K_i) begleitet ist. Beachte, daß während des K_e-undershoot, der mit der post-Carbachol Hyperpolarisation korreliert, sowohl Na_i als auch K_i noch nicht zu ihren Ruhewerten zurückgekehrt sind. B: GABA depolarisiert die Membran eines anderen Neurons um ca. 25 mV. Sowohl K_i als auch die $[Cl^-]_i$ (Cl_i) fallen im Anschluß an die GABA-Depolarisation vorübergehend ab, wohingegen K_e kurzzeitig ansteigt. Beachte, daß weder eine post-GABA Hyperpolarisation noch ein K_e-undershoot festzustellen ist. (Na_i und K_e in A bzw. Cl_i und K_e in B wurden in anderen Ganglien gemessen).

3.4 Hemmstoffe von Ionen-Transportsystemen

Um die Mechanismen zu untersuchen, die zur Wiederherstellung der Ionengradienten im Anschluß an die beobachteten Ionenbewegungen bei Applikation von Carbachol und GABA führen, wurden die Effekte spezifischer Hemmstoffe verschiedener Ionen-Transportsysteme untersucht.

3.4.1 Effekte von Ouabain

Das Herzglykosid Ouabain (g-Strophantin) ist bei den unterschiedlichsten Präparaten ein wirkungsvoller Hemmstoff der Na^+/K^+-ATPase (Thomas, 1972 b). In einer Serie von Experimenten wurde mit Hilfe von Ouabain der Beitrag der Na^+/K^+-Pumpe zur Wiederaufnahme von K^+ und zur Extrusion von Na^+ bei Applikation von Carbachol untersucht. Ein typisches Beispiel für die Blockierung der Wiederaufnahme von freigesetztem K^+ unter Ouabain ist in Abb. 16 zu sehen. Nach einer Kontroll-Applikation in Krebslösung wurde Carbachol in Anwesenheit von Ouabain (300 µmol/l) superfundiert. Das während dieser Carbachol-Applikation freigesetzte K^+ wurde nicht wieder in die Zelle aufgenommen, sondern $[K^+]_i$ fiel sogar im Vergleich zur Kontrolle ($[K^+]_i$-Abfall von 97 auf 88 mmol/l) beträchtlich weiter ab (von 97 auf 65 mmol/l). In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung war unter Ouabain die Repolarisation der Membran unvollständig. Nach Ende der Ouabain-Superfusion jedoch kehrte $[K^+]_i$ wieder auf seinen Ausgangswert zurück, wobei eine beträchtliche Membranhyperpolarisation auftrat.

Ähnliche Daten wie für das intrazelluläre K^+ wurden für das intrazelluläre Na^+ erhalten. Wie in der Abb. 16 dargestellt, verursachten zwei Kontroll-Applikationen von Carbachol bei einem Neuron die typischen Effekte auf Membranpotential und

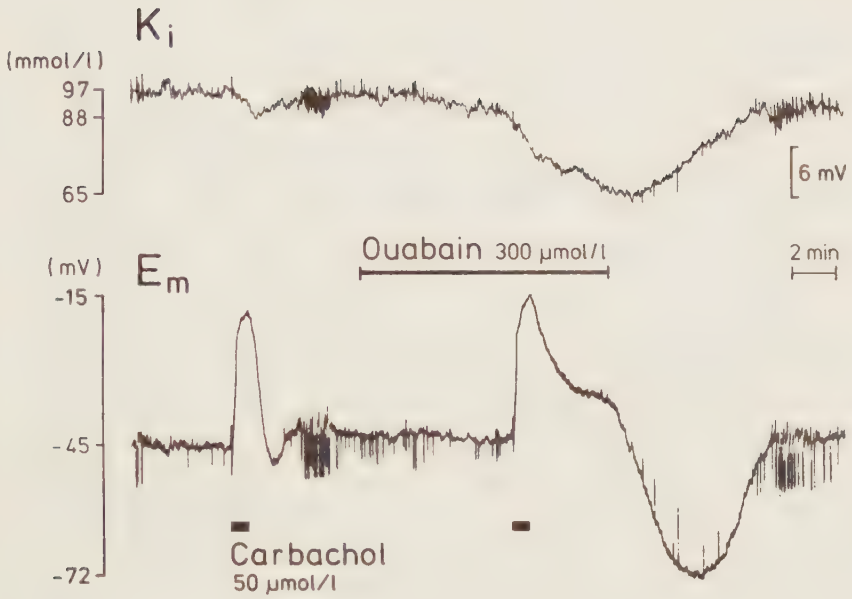

Abb. 15

Effekte von Ouabain auf Carbachol-induzierte Veränderungen der freien intrazellulären K^+-Konzentration (K_i) und des Membranpotentials (E_m) eines sympathischen Neurons. In Krebslösung induzierte Carbachol einen vorübergehenden Abfall der K_i. In der Anwesenheit von Ouabain (300 µmol/l) jedoch folgte auf den initialen Carbachol-induzierten K_i-Abfall ein weiterer Abfall des intrazellulären K^+. Die Repolarisation der Membran war in der Anwesenheit von Ouabain unvollständig. Nach Auswaschen des Ouabain war eine schnelle Wiederaufnahme des K^+, begleitet von einer beträchtlichen Membranhyperpolarisation, zu beobachten. Die Ablenkungen auf beiden Spuren bei Ende der post-Carbachol Hyperpolarisationen sind auf Spontanaktivität des Neurons zurückzuführen.

$[Na^+]_i$. Während der darauffolgenden Superfusion mit Ouabain (300 µmol/l) depolarisierte die Membran um etwa 4 mV. $[Na^+]_i$ stieg während dieser Periode von 2 auf 5 mmol/l an. Unter der Annahme, daß die Na^+/K^+-Pumpe dieser Zelle zu diesem Zeitpunkt vollkommen blockiert war, entspricht dieser Na^+-Anstieg dem passiven Flux von Na^+ über die Leckleitfähigkeit der Membran in die Zelle. Applikation von Carbachol in Anwesenheit von Ouabain resultierte in einer mit den Kontrollen vergleichbaren Membrandepolarisation. $[Na^+]_i$ erhöhte sich jedoch aufgrund der Carbachol-Superfusion auf einen Wert von ca. 30 mmol/l und stieg unter Ouabain auch nach Auswaschen des Carbachols auf etwa 35 mmol/l weiter an. Die bei den Kontrollen nach Ende der Carbachol-Superfusion zu beobachtende Na^+-Extrusion war demnach vollkommen blockiert. Das gleiche gilt für die post--Carbachol Hyperpolarisation, wie schon für die $[K^+]_i$-Messungen unter Ouabain beschrieben (s. Abb. 15). Die Wirkung von Ouabain war, wie bei den $[K^+]_i$-Messungen, schnell reversibel, erkenntlich an dem raschen $[Na^+]_i$-Abfall und der Hyperpolarisation nach Auswaschen des Ouabain. Die post-Ouabain Hyperpolarisationen dauerten sowohl bei den $[K^+]_i$- als auch bei den $[Na^+]_i$-Messungen in der Regel solange an, wie das K^+ unter bzw. das Na^+ über seinem Ruhewert lag. Das Aktionspotential im Einsatz von Abb. 16, welches ca. 2 min vor der letzten Carbachol-Superfusion synaptisch ausgelöst wurde, hatte die gleiche Amplitude wie Aktionspotentiale, die ca. 2 min nach der ersten Carbachol-Superfusion ausgelöst wurden. Dies scheint darauf hinzuweisen, daß die elektrischen Membraneigenschaften der Neurone auch nach beträchtlichen intrazellulären Ionenverschiebungen z.T. unverändert bleiben.

Die oben beschriebenen Versuche scheinen zu bestätigen, daß die Na^+/K^+-Pumpe aufgrund einer Aktivierung ihrer intrazellulären Bindungsstelle durch eingeströmtes Na^+ für die Wiederherstellung der Konzentrationsgradienten für Na^+ und K^+ nach Carbachol verantwortlich ist. Zusätzlich zu dieser intrazellulären Stimu-

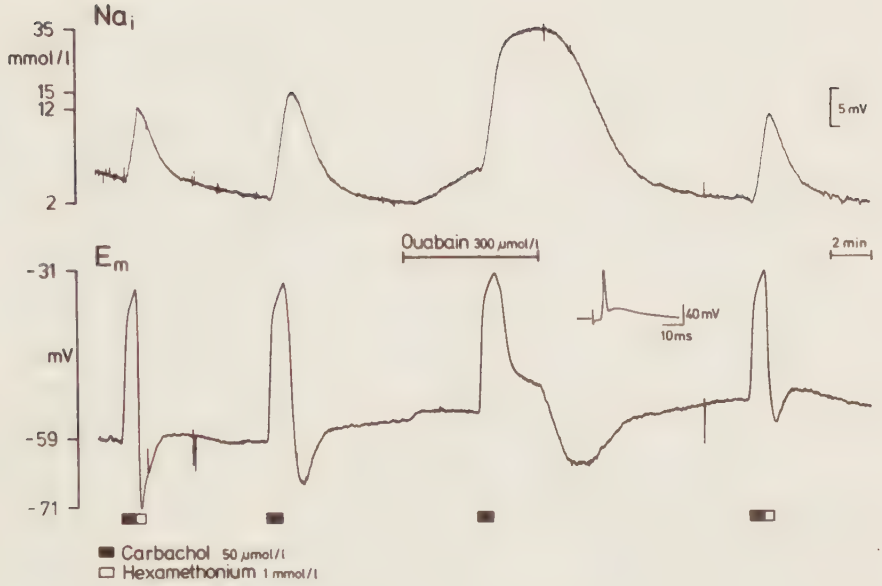

Abb. 16

Effekte von Ouabain auf Carbachol-induzierte Veränderungen der freien intrazelluären Na^+-Konzentration (Na_i) und des Membranpotentials (E_m) eines sympathischen Säugetierneurons. Nach zwei Kontroll-Applikationen von Carbachol wurde Ouabain (300 µmol/l) der Superfusionsflüssigkeit zugefügt. Dies resultierte in einer Membrandepolarisation um etwa 4 mV, die von einem Anstieg der Na_i begleitet wurde. Die Repolarisation der Zellmembran nach Carbachol war in der Anwesenheit von Ouabain unvollständig (vergl. Abb. 15). Außerdem war die Na^+-Extrusion nach Carbachol vollkommen blockiert. Nach Auswaschen des Ouabains kehrte Na_i auf ihren Basiswert bei einer gleichzeitigen Hyperpolarisation der Membran zurück. Der Einsatz zeigt ein Aktionspotential mit einer Amplitude von 100 mV, elektrisch ausgelöst nach der Erholung der Zelle von Ouabain (s. die Ablenkungen auf der Na_i- und der E_m-Spur).

lation der Na^+/K^+-ATPase besteht die Möglichkeit, daß das bei der Carbachol-Aktion freigesetzte K^+ die Na^+/K^+-ATPase durch eine Erhöhung des Substratangebotes an der Außenseite der Membran stimuliert. Aus diesem Grund wurden Experimente durchgeführt, bei denen die K^+-Konzentration der Badlösung durch äquimolare Substitution von NaCl durch KCl erhöht wurde. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abb. 17 dargestellt. Applikation von Carbachol (50 µmol/l) führte zu der typischen Membrandepolarisation, begleitet von einem $[K^+]_i$-Abfall. Darauffolgende Addition von 30 mmol/l KCl depolarisierte die Membran auf etwa -20 mV, begleitet von einem Anstieg des intrazellulären K^+ auf 120 mmol/l. Bei diesem $[K^+]_i$-Anstieg handelt es sich vermutlich um einen sekundären Effekt, da es bei Addition von KCl zu einer Erhöhung der Ionenstärke im Extrazellulärraum kommt. Dies induziert vermutlich einen Ausstrom von Wasser aus den Zellen und damit eine Zellschrumpfung, wodurch sich $[K^+]_i$, relativ gesehen, erhöht. Dies wird bekräftigt durch Addition von 60 mmol/l Saccharose zur Krebslösung, was zu einem $[K^+]_i$-Anstieg führt, der dem bei Addition von 30 mmol/l KCl vergleichbar ist. Die Membran hyperpolarisiert, weil vermutlich $[K^+]_e$ durch den Ausstrom von Wasser, relativ gesehen, erniedrigt wird. Bei äquimolarem Austausch von 40 mmol/l NaCl durch KCl hingegen bleibt $[K^+]_i$ trotz einer beträchtlichen Depolarisation der Membran unverändert, was darauf hinzuweisen scheint, daß die Freisetzung von K^+ in den Extrazellulärraum die Na^+/K^+-Pumpe nicht zusätzlich von außen stimuliert und/oder, daß die Na^+/K^+-Pumpe bei der $[K^+]_e$-Ruhekonzentration von 6 mmol/l bereits maximal aktiviert ist.

Die Beobachtungen, daß die GABA-induzierte neuronale K^+-Freisetzung nicht von einem $[Na^+]_i$-Anstieg begleitet ist, und daß die Erhöhung der $[K^+]_e$ oberhalb von 6 mmol/l die Na^+/K^+-Pumpe vermutlich nicht stimuliert, führen zu der Frage, ob diese Ionenpumpe zu der K^+-Wiederaufnahme nach Ende der GABA-Applikation überhaupt beiträgt. Zur Untersuchung dieses Problems wurden die Effekte

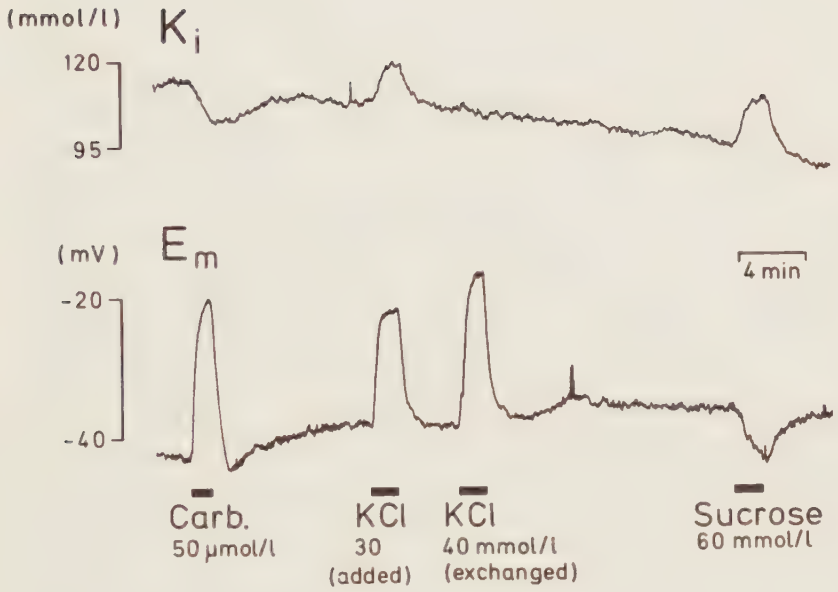

Abb. 17

Effekte der Erhöhung der extrazellulären K^+-Konzentration auf die freie intrazelluläre K^+-Konzentration (K_i) und das Membranpotential (E_m) bei einem sympathischen Säugetierneuron. Applikation von Carbachol (50 µmol/l) führte zu der typischen Membrandepolarisation, begleitet von einem K_i-Abfall. Bei Addition von 30 mmol/l KCl depolarisierte die Membran auf ca. -20 mV, während K_i auf 120 mmol/l anstieg. Im Gegensatz dazu blieb K_i trotz der größeren Membrandepolarisation bei Superfusion mit einer Lösung, bei der 40 mmol/l NaCl durch KCl ausgetauscht wurde, unverändert. Beachte, daß bei Addition von 60 mmol/l Saccharose K_i vergleichbar mit der Addition von 30 mmol/l KCl ansteigt, wobei die Zellmembran hyperpolarisiert.

von Ouabain auf die Kinetik der $[K^+]_e$ während und nach Superfusion mit GABA bzw. Carbachol analysiert. Ein typisches Beispiel eines derartigen Experimentes zeigt Abb. 18. In normaler Krebslösung resultierte die Applikation von GABA in einer vorübergehenden Erhöhung der $[K^+]_e$ von ihrem Basiswert 6.0 auf 7.8 mmol/l. Die Rückkehr der $[K^+]_e$ zur Basislinie dauerte etwa 6 min. Applikation von Carbachol erhöhte $[K^+]_e$ von 6.0 auf 9.0 mmol/l. Die Rückkehr zur Basislinie dauerte jedoch trotz einer größeren K^+-Freisetzung lediglich 2 min und wurde gefolgt von einem $[K^+]_e$-"undershoot". Ein derartiger undershoot wurde bei Applikation von GABA in keinem Falle beobachtet. Superfusion mit 300 µmol/l Ouabain erhöhte $[K^+]_e$ vorübergehend auf 6.2 mmol/l (s. gepunktete Linie der mittleren Spur). Die Kinetik der GABA-induzierten $[K^+]_e$-Anstiege und -Rückkehrperioden war durch Ouabain im Vergleich zu den Kontrollen nicht beeinflußt. Dahingegen war die $[K^+]_e$-Rückkehr nach Carbachol unter Ouabain beträchtlich verzögert und der $[K^+]_e$-undershoot vollkommen blockiert. Diese Effekte von Ouabain auf die Carbachol-induzierten $[K^+]_e$-Veränderungen waren, wie für $[K^+]_i$ und $[Na^+]_i$ bereits gezeigt, schnell reversibel (s. untere Spur in Abb. 18 A). Die abwechselnde Applikation von GABA und Carbachol bei einer "elektrisch nicht erregbaren" (Glia-) Zelle (in Abb. 18 B) zeigen, daß sich die Membran dieser Zelle wie eine K^+-ISME verhält. Dies äußert sich in der Ähnlichkeit der Kinetik der Membranpotentialveränderungen unter GABA und Carbachol mit den in Abb. 18 A gemessenen Veränderungen der $[K^+]_e$ (vergl. unteren Einsatz in Abb. 12).

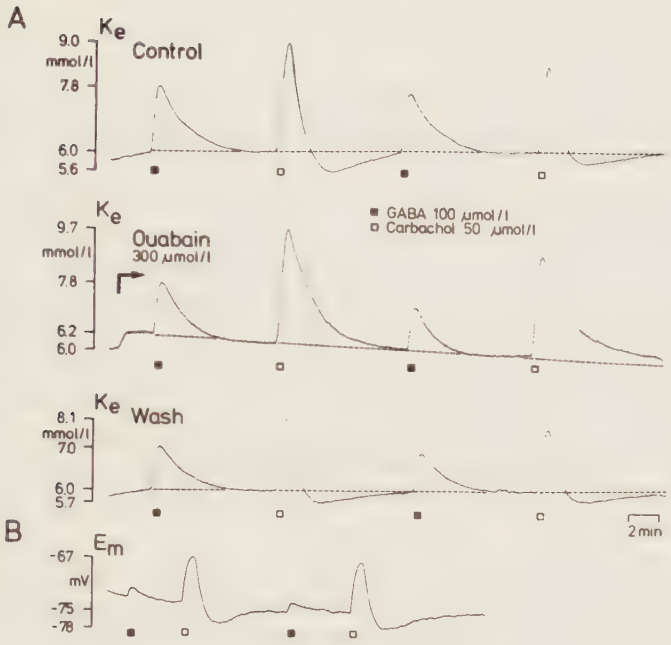

Abb. 18

A: Effekte von Ouabain auf Carbachol- und GABA-induzierte Veränderungen der freien extrazellulären K^+-Konzentration (K_e). Bei der Kontroll-Applikation erhöht GABA K_e vorübergehend um etwa 2 mmol/l. Die K_e-Anstiege unter Carbachol waren größer. Die Kinetik der Rückkehr der K_e nach Carbachol und nach GABA ist unterschiedlich (s. den K_e-"undershoot" nach Carbachol). Bei Superfusion mit Ouabain (siehe Pfeil in A) ist der K_e-undershoot nach Carbachol blockiert und die K_e-Rückkehr verzögert, wohingegen die K_e-Rückkehr nach GABA unverändert ist. Die Effekte von Ouabain sind reversibel (s. wash). B: zeigt die Effekte von Carbachol und GABA (gleiche Symbole und Konzentrationen wie in A) auf das Membranpotential einer Gliazelle. Beachte, daß die Kinetik der K_e-Messung mittels ionensensitiver Mikroelektroden und des Membranpotentialverlaufs der Gliazelle ähnlich ist.

3.4.2 Effekte von Furosemid

Das Fehlen sowohl von GABA-induzierten Anstiegen des intrazellulären Na^+ als auch von Ouabain-Effekten auf die Wiederaufnahme von unter GABA freigesetztem K^+ deuten darauf hin, daß für die Wiederherstellung des K^+-Konzentrationsgradienten nach Applikation von GABA ein Ouabain-insensitiver K^+-Wiederaufnahmemechanismus, der unterschiedlich zur Na^+/K^+-Pumpe ist, verantwortlich sein könnte. Zur näheren Charakterisierung dieses Transportmechanismus wurden die Effekte von Furosemid (0.5 bis 1 mmol/l) auf $[K^+]_e$, $[K^+]_i$ und $[Cl^-]_i$ untersucht. Von Furosemid weiß man, daß es einen Cl^--abhängigen K^+-Influx bei Erythrozyten (Duhm & Göbel, 1984; Dunham et al., 1980), Aszites-Tumorzellen (Geck et al., 1980), beim Riesenaxon des Tintenfisches (Russell, 1983) sowie bei einer Vielzahl von Zellen in Kultur (Aiton et al., 1981) blockiert.

Intrazelluläre Messungen mit K^+-sensitiven Mikroelektroden zeigten, daß Furosemid den Ruhewert der $[K^+]_i$ erniedrigte und die Wiederaufnahme von freigesetztem K^+ unter GABA stark verzögerte oder vollkommen blockierte. Abb. 19 A zeigt, daß $[K^+]_i$ bei Kontroll-Applikation von GABA auf ihren Ausgangswert zurückkehrt bzw. nach der zweiten Applikation noch weiter ansteigt. Vergleichbare GABA-Superfusionen unter Furosemid (0.5 mmol/l, 15 min) führten zu einer Abnahme der Amplitude der GABA-Depolarisation um ca. 6 mV. Im Unterschied zu den Kontrollen jedoch kehrte $[K^+]_i$ unter Furosemid nicht auf ihren Ausgangswert zurück, sondern fiel nach der vierten GABA-Applikation sogar weiter ab (auch nach Auswaschen des Furosemid). Im Gegensatz dazu nahm nach dem Ende der Furosemid-Superfusion die Amplitude der GABA-Depolarisation wieder zu.

Messungen mit extrazellulären K^+-sensitiven Mikroelektroden zeigten, daß Furosemid weder die Amplitude noch die Kinetik von Carbachol-induzierten $[K^+]_e$-Veränderungen beeinflußt. Ins-

besondere der $[K^+]_e$-undershoot nach Carbachol bleibt unter Furosemid unverändert (Abb. 19 B). Auf der anderen Seite jedoch reduzierte Furosemid die Amplitude des $[K^+]_e$-Anstieges und verlangsamte die Rückkehr von $[K^+]_e$ nach GABA (Abb. 19 B).

Abb. 20 illustriert zwei Experimente, bei denen die Effekte von Furosemid auf $[Cl^-]_i$ untersucht wurden. Kurzzeitige Applikation von Furosemid (0.5 mmol/l, 6 min) verzögerte eindeutig die Wiederaufnahme von freigesetztem Cl^- bei Applikation von GABA (Abb. 20 A). Dieser Effekt war innerhalb von 20 min reversibel. Längere Superfusion mit Furosemid (0.5 mmol/l, 10 bis 20 min) führte bei einem anderen Neuron zu einer Abnahme des Ruhewertes der $[Cl^-]_i$ und für 2 h oder länger zu einer vollkommenen Blockierung der post-GABA Cl^--Wiederaufnahme in die Zellen (Abb. 20 B).

Zusätzlich zu diesen Effekten auf die Wiederaufnahme von Cl^- in die Zellen verkleinerte Furosemid die Amplitude der GABA-induzierten Membrandepolarisation (Abb. 19 A, 20, 21 C). Dies könnte bedingt sein durch eine Veränderung des Cl^--Gleichgewichtspotentials und/oder durch eine Blockierung des GABA-Rezeptor assoziierten Cl^--Kanals (s. 4.4).

3.4.3 Effekte von DIDS

Zur näheren Charakterisierung des Mechanismus, der für die Wiederaufnahme von K^+ und Cl^- nach der Wirkung von GABA verantwortlich ist, wurden Experimente durchgeführt, bei denen DIDS verwendet wurde. DIDS hemmt bei unterschiedlichen Präparaten den reinen Anionen-Austausch (Cl^-/HCO_3^--Austausch; Aickin & Brading, 1982, 1983; Cala, 1980, 1983).

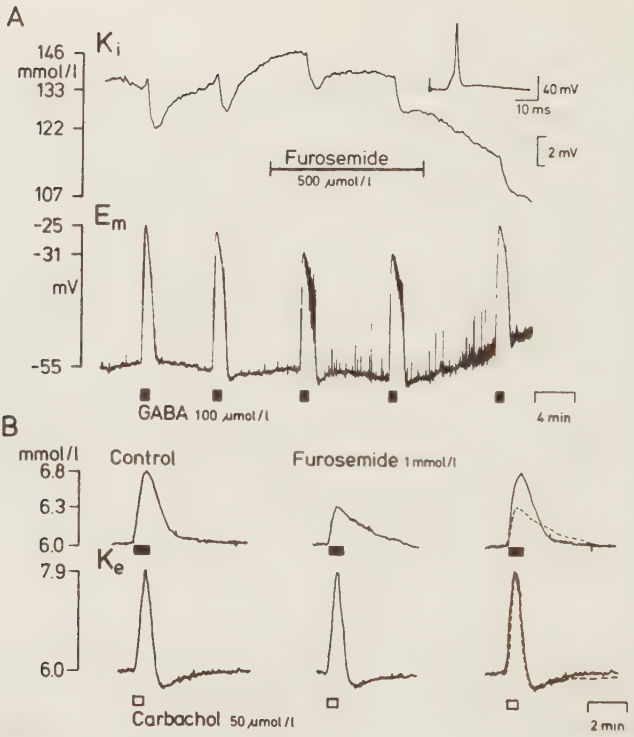

Abb. 19

Effekte von Furosemid auf GABA-induzierte Veränderungen der freien intrazellulären und extrazellulären K^+-Konzentration (K_i in A und K_e in B). A: Intrazelluläre Ableitung mit einer K^+-sensitiven Mikroelektrode. Beachte, daß Furosemid die Wiederaufnahme von freigesetztem K^+ nach GABA blockiert. Der Einsatz zeigt ein durch orthodrome Stimulation ausgelöstes Aktionspotential. Beachte, daß Furosemid die Amplitude der GABA-Depolarisation reduziert. B: Extrazelluläre Ableitung mit einer K^+-sensitiven Mikroelektrode. Furosemid reduziert die Amplitude des GABA-induzierten K_e-Anstieges und verzögert die K_e-Rückkehr. Furosemid veränderte jedoch nicht den post-Carbachol K_e-undershoot. Die schwarzen Rechtecke in B symbolisieren wie in A die Superfusion mit GABA (100 µmol/l). Die K_i-Spur in A wurde mit 0.1 Hz (Tiefpaß) gefiltert.

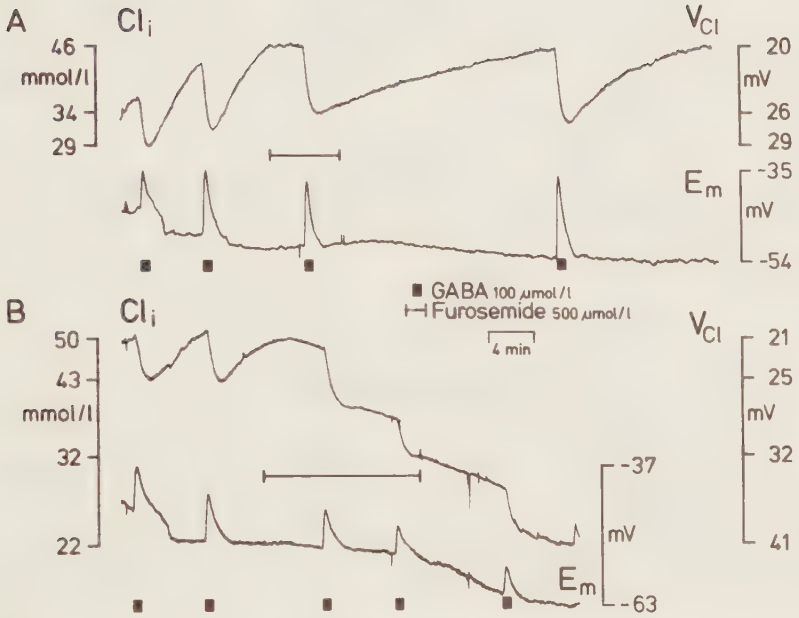

Abb. 20

Effekte von Furosemid auf GABA-induzierte Veränderungen der freien intrazellulären Cl^--Konzentration (Cl_i) und des Membranpotentials eines sympathischen Säugetierneurons. A: illustriert die Wirkung einer kurzzeitigen Applikation von Furosemid (500 µmol/l). Beachte, daß die Wiederaufnahme von Cl^-, welches unter GABA freigesetzt wurde, stark verzögert ist. B: zeigt eine längere Applikation von Furosemid (500 µmol/l). Beachte, daß hierbei die Cl^--Wiederaufnahme in die Zelle vollkommen blockiert ist. Die Kalibrierung der Cl_i-Spuren erfolgte sowohl als freie Ionenkonzentration (Cl_i) als auch als Spannung des Ionensignales (V_{Cl}).

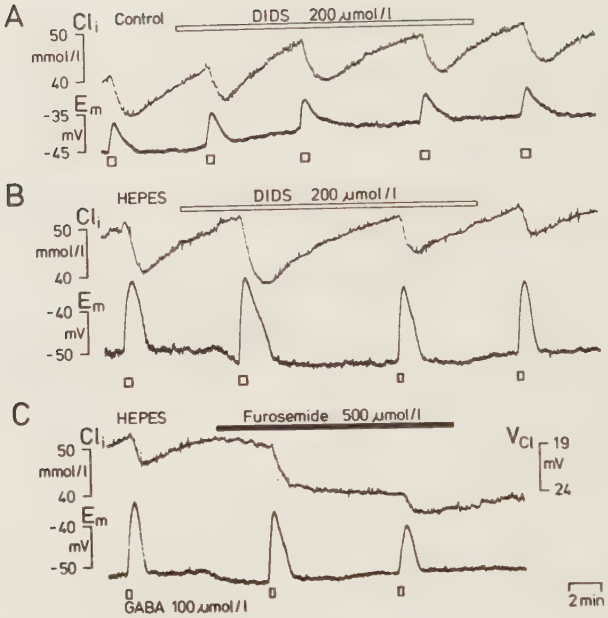

Abb. 21

Effekte von DIDS und Furosemid auf GABA-induzierte Veränderungen der intrazellulären Cl^--Konzentration (Cl_i) und des Membranpotentials (E_m) in Bicarbonat-freier Lösung. A, B: Applikation von DIDS (200 µmol/l) hat weder in Bicarbonat-haltiger (in A) noch in Bicarbonat-freier Lösung (in B) einen Einfluß auf die Wiederaufnahme von Cl^-, welches unter GABA freigesetzt wurde. C: Zusatz von Furosemid zum Bicarbonat-freien HEPES-Ringer führte bei der gleichen Zelle zu einem Abfall der Cl_i und zur Blockierung der Wiederaufnahme des unter GABA freigesetzten Cl^-. Beachte, daß sich das Membranpotential der Zelle im Zeitraum zwischen den Messungen von A und B verbesserte. Die Kalibrierung der Cl_i-Spur als Spannung (V_{Cl}) in C sowie die Angabe der GABA-Konzentration gelten auch für A und B.

Messungen mit intrazellulär positionierten Cl^--sensitiven Mikroelektroden zeigten, daß DIDS (100-200 µmol/l) weder auf den Ruhewert der $[Cl^-]_i$ noch auf die Kinetik der GABA-induzierten $[Cl^-]_i$-Abfälle einen Einfluß hatte (Abb. 21 A,B). Entsprechendes gilt für Experimente, bei denen GABA-induzierte $[Cl^-]_i$-Abfälle in HCO_3^--freiem HEPES-Ringer untersucht wurden.

Bei verschiedenen Präparaten scheint extrazelluläres Bicarbonat für die Wiederaufnahme von Cl^- in die Zellen erforderlich zu sein (Vaughan-Jones, 1979 a, b; Aickin & Brading, 1982, 1983). Extrazelluläres Bicarbonat war beim Cervicalganglion der Ratte jedoch für die Wiederaufnahme von Cl^-, welches unter GABA freigesetzt wurde, nicht erforderlich. Selbst zusätzliche Superfusion mit DIDS hatte in HEPES-Ringer keinen mit der Wirkung von Furosemid vergleichbaren blockierenden Effekt auf die Wiederaufnahme von Cl^- in die Zellen (Abb. 21 B). Abb. 21 C hingegen zeigt für die gleiche Zelle wie bei den Messungen in Abb. 21 A und B, daß unter Furosemid auch in HEPES-Ringer der Ruhewert der $[Cl^-]_i$ abnimmt und die Cl^--Wiederaufnahme nach GABA blockiert ist (vergl. Abb. 20 B).

3.4.4 Vergleich der Hemmstoffe von Ionen-Transportsystemen

Die Ergebnisse unter 3.4.1 bis 3.4.3 zeigen, daß Ouabain, Furosemid und DIDS unterschiedliche Effekte auf die Wiederherstellung der Ionengradienten im Anschluß an die Wirkungen von Carbachol und GABA haben. Ouabain blockiert spezifisch die Na^+/K^+-Pumpe beim Cervicalganglion der Ratte. Die Blockierung äußerte sich in den Anstiegen der $[Na^+]_i$ und der $[K^+]_e$ unter Ruhebedingungen (vergl. Abb. 16 und 18 A) und einem entsprechenden Abfall der $[K^+]_i$ (s. Abb. 15) in Anwesenheit von Ouabain. Im Anschluß an die Wirkung von Carbachol waren unter Ouabain sowohl die Na^+-Extrusion als auch die K^+-Wiederaufnahme sowie der $[K^+]_e$-undershoot vollkommen blockiert. Im Gegensatz dazu scheint

Ouabain die K^+-Wiederaufnahme nach GABA nicht zu beeinflussen (s. Abb. 18 A), während Furosemid, der Hemmstoff des $Na^+/K^+/Cl^-$-Cotransports sowohl die Wiederaufnahme von K^+ als auch von Cl^-, die beide unter GABA freigesetzt werden, blockiert (Abb. 19, 20). Andererseits scheint Furosemid die Wiederaufnahme von unter Carbachol freigesetztem K^+ nicht zu beeinflussen (s. Abb. 19 B). Zusätzlich kommt es unter Furosemid zu einer Abnahme der Ruhewerte der $[K^+]_i$ und $[Cl^-]_i$. Vergleichbare Applikationen von DIDS resultierten in der Regel in keiner mit den Effekten von Furosemid vergleichbaren Beeinflussung des Ruhewertes der $[Cl^-]_i$ oder der GABA-induzierten Cl^--Verschiebungen.

4 Diskussion

4.1 Eigenschaften der Austauscherharze

Bei den Untersuchungen wurden K^+-, Na^+- und Cl^--sensitive Mikroelektroden (ISME) mit entsprechenden Flüssigkeitsaustauschern benutzt. Alle Austauscherharze unterliegen jedoch Beschränkungen bei der Interpretation der gemessenen Spannungsänderungen als Ionenkonzentrationen. Dies soll im folgenden diskutiert werden.

Bei Verwendung des K^+-Ionenaustauschers (Corning 477317) ist insbesondere dessen Sensitivität für Na^+ und quarternäre Ammoniumionen zu berücksichtigen. Eine Reiz-induzierte Freisetzung von Acetylcholin, dem Neurotransmitter im sympathischen Ganglion der Ratte, sowie die Applikation des Acetylcholinrezeptor-Agonisten Carbachol könnten somit zum Spannungssignal bei den extra- bzw. intrazellulären K^+-Messungen beitragen. Für den Extrazellulärraum kann dies jedoch ausgeschlossen werden, weil mit Valinomycin-gefüllten K^+-ISME, deren Sensitivität für quarternäre NH_4-Ionen zu vernachlässigen ist (Oehme, 1977), quantitativ vergleichbare Veränderungen der $[K^+]_e$ gemessen wurden. Intrazelluläre Messungen konnten aufgrund des extrem hohen Widerstandes der Valinomycin K^+-ISME bei Spitzendurchmessern unter 0.3 µm nicht durchgeführt werden. Es zeigte sich jedoch, daß sich die Sensitivität des Corning-Ionenaustauschers gegenüber Carbachol und Acetylcholin mit abnehmendem Spitzendurchmesser verringerte (eigene Beobachtungen; Schlue, persönliche Mitteilung). Bedingt durch die Na^+-Empfindlichkeit des K^+-Austauschers mußte bei intrazellulären K^+-Messungen die Spannungsänderung für den Sprung von $[Na^+]_e$ (143 mmol/l) zu $[Na^+]_i$ (ca. 10 mmol/l) berücksichtigt werden (s. 2.3.3). Die Beeinflussung durch die übrigen superfundierten Substanzen wie z.B. GABA, Ouabain oder Furosemid war so gering, daß sie bei der Interpretation der Spannungssignale der K^+-, Cl^-- oder Na^+-ISME vernachlässigt werden konnte.

Bei der Bestimmung der $[Na^+]_i$ mußte die Empfindlichkeit des Na^+-Ionenaustauschers ETH 227 für Ca^{++} berücksichtigt werden (s.2.3.4). Die Ca^{++}-Beteiligung am Spannungssignal bei den Na^+-Messungen ist vermutlich minimal, wie intrazelluläre Messungen mit Ca^{++}-sensitiven Mikroelektroden beim Cervicalganglion der Ratte (eigene Beobachtungen) bzw. in Nervenzellen von Schnekken zeigten, bei denen während einer Membrandepolarisation um 50 mV mit einer Dauer von 20 s Spannungsänderungen des Ca^{++}-Signals um lediglich 1 bis 2 mV auftraten (Hofmeier & Lux, 1981). Von daher ist es unwahrscheinlich, daß die mit den Na^+-sensitiven Mikroelektroden in dieser Arbeit beobachteten Spannungsänderungen von z.T. mehr als 30 mV überwiegend durch einen Anstieg der $[Ca^{++}]_i$ bedingt sein sollten. Zudem ist seit einiger Zeit bekannt, daß wirksame Puffermechanismen des Cytoplasmas und der Zellorganellen $[Ca^{++}]_i$ sehr niedrig halten und damit große Anstiege des intrazellulären Ca^{++} verhindern (Baker & Schlaepfer, 1978). Im Gegensatz zu der vermutlich geringen Beteiligung von Ca^{++} an Veränderungen der $[Na^+]_i$ war der Ca^{++}-Anteil am Spannungssignal der Na^+-sensitiven Mikroelektroden bei den Messungen der Ruhewerte der $[Na^+]_i$ zu berücksichtigen (s.2.3.4). Der Abfall der $[Ca^{++}]$ beim Sprung vom Extra- in den Intrazellulärraum entsprach einem Spannungssprung der Na^+-Elektroden von z.T. mehr als 10 mV (s. Abb. 4).

Bei den Messungen mit dem Cl^--Austauscher (IE-170, WPI) sind Aussagen über den genauen Wert der $[Cl^-]_i$ aufgrund der relativ schlechten Selektivität gegenüber anderen Anionen schwierig (s. 2.3.5). Aus diesem Grund wurden sowohl $[Cl^-]_i$-Messungen mit K-Sulfat als auch mit K-Azetat als Elektrolytlösung des Referenzkanals der Cl^--ISME durchgeführt, um zu untersuchen, ob aus den Elektroden diffundierendes Sulfat oder Azetat die Ruhewerte des intrazellulären Cl^- verfälscht. Dies scheint jedoch nicht der Fall zu sein, da sich die mit beiden Arten von Cl^--ISME gemessenen Basiswerte der $[Cl^-]_i$ nicht signifikant

unterscheiden (40.4 bzw 41.5 mmol/l, s. Tab. 1). Die Interferenzen intrazellulärer Anionen dürften aus den folgenden Gründen ebenfalls keine große Bedeutung für die $[Cl^-]_i$-Messungen haben. Zum einen stimmt das Spitzenpotential der GABA-induzierten Membrandepolarisation (-24.2 mV bei 1 mol/l Mg-Azetat als Elektrolytlösung des Referenzkanals) recht gut überein mit dem kalkulierten Gleichgewichtspotential für Cl^- (E_{Cl} = -27 mV, s. Tab. 1). Zum anderen war zu beobachten, daß in Cl^--armen Lösungen (Cl^- durch Glucuronat substituiert) $[Cl^-]_i$ sich einem Wert annäherte, der gemäß den angelegten Eichkurven in etwa der Cl^--Konzentration der Cl^--armen Lösung entsprach. Eine Beteiligung interferierender Anionen am Spannungssignal der Cl^--sensitiven Mikroelektroden mit 2 bis 3 mV ist jedoch nicht auszuschließen (vergl. Deisz & Lux, 1982; Vaughan-Jones, 1979 a, b).

4.2 Ruhewerte der freien Ionenkonzentrationen

Im folgenden sollen die Ruhewerte der $[K^+]_e$, $[K^+]_i$, $[Na^+]_i$ und $[Cl^-]_i$ diskutiert werden. Vorab ist es jedoch zweckmäßig, auf mögliche Artefakte aufgrund von penetrationsbedingten Zell- bzw. Gewebsschädigungen bei den Messungen einzugehen.

Bei den intrazellulären Messungen mit doppelläufigen ionensensitiven Mikroelektroden wird beim Einstich vermutlich eine Zellschädigung hervorgerufen. Die Messungen zeigten jedoch, daß die Zellen in der Lage sind, die durch das Membranleck bedingten Verschiebungen der Ionenkonzentrationsgradienten zumindest teilweise zu überwinden (s. 3.1). Im Anschluß an diese "Einheilungsphase" konnte z.T. mehrere Stunden abgeleitet werden, ohne daß sich die intrazellulären Ionenkonzentrationen im Rahmen der Meßgenauigkeit veränderten oder Ruhemembranpotential bzw. Aktionspotentialamplitude sich verschlechterten. Die mittleren Werte für das Ruhemembranpotential bzw. für die Aktionspotentialamplitude (zwischen -46.8 und -50.1 mV, bzw.

76.7 und 91.8 mV; s. Tab. 1) stimmen recht gut mit den Werten bei intrazellulärer Ableitung mit Einzelelektroden im Cervicalganglion der Ratte überein (Adams & Brown, 1975).

Bei den extrazellulären K^+-Messungen wird der Extrazellulärraum durch das Eindringen der doppelläufigen ionensensitiven Mikroelektrode künstlich um ein Vielfaches erweitert. Nach einem Zeitraum von ca. 30 min kann man jedoch davon ausgehen, daß sich das extrazelluläre Ionenmilieu reequilibriert hat (vergl. Nicholson, 1981). Aufgrund der Volumenvergrößerung des Extrazellulärraumes in der Umgebung der Elektrodenspitze kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß die Amplitude der gemessenen $[K^+]_e$-Antworten kleiner und deren Zeitverlauf infolge längerer Diffusionswege verlangsamt ist (Walz & Hertz, 1983).

Der Ruhewert der freien extrazellulären K^+-Konzentration beim Cervicalganglion der Ratte entspricht der K^+-Konzentration der Krebslösung. Im Vergleich dazu ist die freie extrazelluläre K^+-Konzentration bei Präparaten wie dem Blutegelganglion (Schlue & Deitmer, 1980) oder der Bienenretina (Coles & Tsacopoulus, 1979) höher als die des Bades. Diese Unterschiede dürften hauptsächlich auf der Entfernung der Neuralscheide um das Ganglion (s. 2.1) als natürliche Diffusionsbarriere zur Aufrechterhaltung eines konstanten extrazellulären Ionenmilieus beruhen. Die daraus resultierende Möglichkeit der relativ schnellen Diffusion von Ionen ist bei der Diskussion der extrazellulären K^+- Messungen zu berücksichtigen.

Der durchschnittliche Ruhewert der freien intrazellulären K^+-Konzentration (129.7 mmol/l) stimmt recht gut mit den $[K^+]_i$-Werten bei anderen Geweben wie z.B. bei Herzmuskelfasern des Frosches (127 mmol/l; Lev, 1964), beim Kaninchen Papillarmuskel (135 mmol/l; Lee & Fozzard, 1975) oder bei Retziuszellen des Blutegels (135 mmol/l; Deitmer & Schlue, 1981) überein. Höher im Vergleich zu diesen Werten, die mit K^+-ISME ermittelt wurden, sind die

Werte, die mittels Flammphotometrie oder Elektronenstrahlmikrosonde beim Cervicalganglion der Ratte (205 mmol/kg Zellwasser; Brown & Scholfield, 1974; 196 mmol/kg Zellwasser; Galvan et al., 1984) oder mittels Atomabsorptionsspektrometrie beim Cervicalganglion des Kaninchens (163 mmol/kg Zellwasser; Woodward et al., 1969) ermittelt wurden. Diese Diskrepanz könnte z.T. darauf beruhen, daß ein Teil des intrazellulären K^+ gebunden vorliegt und von daher mit ionensensitiven Mikroelektroden nicht erfaßt werden kann.

Der mittlere Ruhewert für die freie intrazelluläre Na^+-Konzentration (7.7 mmol/l) stimmt gut überein mit Messungen an den unterschiedlichsten Präparaten. So beträgt $[Na^+]_i$ bei Schneckenneuronen 6.3 mmol/l (Thomas, 1972 a), bei Schafherz Purkinjefasern 9.7 mmol/l (Ellis, 1977) oder bei Retziuszellen des Blutegels 10.7 mmol/l (Deitmer & Schlue, 1983). Messungen mittels Flammphotometrie, Atomabsorptionsspektrometrie oder Elektronenstrahlmikrosonde zeigen im Gegensatz dazu recht unterschiedliche Werte für $[Na^+]_i$ in sympathischen Ganglienzellen (5 mmol/kg Zellwasser, Galvan et al., 1984; 22 mmol/kg Zellwasser, Brown & Scholfield, 1974; 37 mmol/kg Zellwasser Woodward et al., 1969). Die Summe der in dieser Arbeit gemessenen intrazellulären Ruhekonzentrationen für Na^+ und K^+ beträgt 137.4 mmol/l, was bei einer Summe der extrazellulären Konzentrationen dieser monovalenten Kationen von 149 mmol/l in etwa mit der Annahme übereinstimmt, daß bei den meisten tierischen Zellen die Gesamtaktivität der monovalenten Kationen intra- und extrazellulär identisch ist (Thomas & Cohen, 1981).

Der Ruhewert der $[Cl^-]_i$ mit etwa 41 mmol/l bestätigt die Annahme einer nicht-passiven Verteilung von Cl^- bei Säugetierneuronen (Adams & Brown, 1975; Gallagher et al., 1978; 1983). Bei passiver Verteilung des Cl^- würde $[Cl^-]_i$ entsprechend einem Ruhemembranpotential von -50 mV 16.5 mmol/l betragen. Vergleichbare Befunde wurden für eine Vielzahl anderer Präparationen gefunden wie

z.B. bei glatten Muskelzellen des Meerschweinchens (Aickin & Vernuë, 1983), bei Schafherz Purkinjefasern (Vaughan-Jones, 1979 a) oder beim Tintenfisch Riesenaxon (Keynes, 1963). Diese Befunde lassen beim Cervicalganglion auf ein einwärts gerichtetes Transportsystem für Cl^- schließen. Einwärts oder auswärts gerichtete "Cl^--Pumpen" sind für Neurone von Invertebraten (Deisz & Lux, 1982; Keynes, 1963; Russell & Brown, 1972) und Vertebraten (Lux, 1971) beschrieben (s. auch 4.4). Durch den Nachweis derartiger Cl^--Pumpen konnte bei vielen Nervenzellen die Annahme der Erhöhung der Membranleitfähigkeit für Cl^- als hauptsächlicher ionaler Mechanismus von inhibitorischen postsynaptischen Potentialen (IPSPs) bestätigt werden (Adams & Brown, 1975; Deisz & Lux, 1982; Gallagher et al., 1983; Lux, 1971).

4.3 Ionenbewegungen unter Carbachol

Bei sympathischen Ganglien ist Acetylcholin der Neurotransmitter der präganglionären Neurone (Brown, 1983). Der Acetylcholin-Agonist Carbachol depolarisiert sympathische Neurone der Ratte durch Aktivierung nikotinischer Acetylcholin-Rezeptoren (Brown et al., 1971). Diese Rezeptoren sind gekoppelt an große Kationen-selektive Membrankanäle (Yoshikami, 1981), die in geöffnetem Zustand einen Einstrom von Na^+ entlang seinem Konzentrationsgradienten in die Zelle erlauben. Die beobachtete Erhöhung der $[Na^+]_i$ bei Applikation von Carbachol ist von daher bedingt durch einen Rezeptor-gekoppelten Na^+-Influx. Eine zusätzliche Aktivierung von spannungsabhängigen Na^+-Kanälen ist unwahrscheinlich, da die Carbachol-induzierten Anstiege der $[Na^+]_i$ in der Anwesenheit von Tetrodotoxin (TTX), einem selektiven Blocker spannungsabhängiger Na^+-Kanäle, unverändert waren (s. Abb. 10). Auf der anderen Seite jedoch blockierte TTX den $[Na^+]_i$-Anstieg, welcher bei der Wirkung von Veratridine, einer Substanz, die spannungsabhängige Na^+-Kanäle aktiviert (Narahashi, 1974), zu beobachten war.

Der Anstieg der $[Na^+]_i$ unter Carbachol (bis zu 30 mmol/l) war bei Zellen mit vergleichbarem Ruhemembranpotential von einem entsprechenden Abfall der $[K^+]_i$ begleitet. Äquivalente Carbachol-induzierte $[Na^+]_i$-Anstiege und $[K^+]_i$-Abfälle wurden ebenfalls beim Cervicalganglion der Ratte mittels Flammphotometrie (Brown & Scholfield, 1974) bzw. Elektronenstrahlmikrosonde (Galvan et al., 1984) gefunden. Dabei war der Zeitverlauf des $[K^+]_i$-Abfalls den Carbachol-induzierten $^{42}K^+$- oder $^{86}Rb^+$-Fluxen, die von Scholfield (1977) ebenfalls beim Cervicalganglion der Ratte gemessen wurden, sehr ähnlich. Scholfield beschreibt ebenfalls, daß die Kinetik des Abfalls und der Wiederaufnahme des K^+ in Anwesenheit von Hexamethonium verändert war, was sich auch bei den intrazellulären K^+- (und Na^+-) Messungen in dieser Arbeit zeigte (s. 3.3).

Der $[K^+]_i$-Abfall unter Carbachol beruht vermutlich auf einer Erhöhung sowohl der K^+-Leitfähigkeit als auch der treibenden Kraft für K^+ während der (z.T. beträchtlichen) Membrandepolarisation. Dabei könnten unterschiedliche K^+-permeable Kationenkanäle, Leckkanäle oder spannungsabhängige Kanäle beteiligt sein (Adams et al., 1982).
Die Beobachtung, daß trotz der beträchtlichen Membrandepolarisationen und der $[Na^+]_i$- bzw. $[K^+]_i$-Verschiebungen $[Cl^-]_i$ unverändert blieb, entspricht der Vorstellung, daß der an den Acetylcholinrezeptor gekoppelte Membrankanal für Anionen nicht permeabel ist (Edwards, 1982). Galvan und Mitarbeiter (1984) stellten beim Cervicalganglion der Ratte ebenfalls keine signifikante Veränderung der $[Cl^-]_i$ unter Carbachol fest.

Die Carbachol-induzierten Veränderungen der $[Na^+]_i$ und $[K^+]_i$ entsprechen den Beobachtungen, die im Rückenmark des Frosches während der Wirkung von Glutamat gemacht wurden (Bührle & Sonnhof, 1983 b). Dies deutet darauf hin, daß unterschiedliche Rezeptoren mit den Na^+-permeablen Membrankanälen verbunden sein können.

Beim Cervicalganglion der Ratte scheint die Na^+/K^+-Pumpe für die Wiederherstellung der Ionenkonzentrationsgradienten für Na^+ und K^+ nach Applikation von Carbachol verantwortlich zu sein. Diese Annahme wird unterstützt durch die Beobachtung, daß sowohl die Na^+-Extrusion, als auch die K^+-Wiederaufnahme nach Carbachol in der Anwesenheit von Ouabain vollkommen blockiert waren (s. Abb. 15, 16). In Übereinstimmung damit war unter Ouabain die Rückkehr der $[K^+]_e$ auf ihren Basiswert stark verzögert und der $[K^+]_e$-undershoot fehlte vollkommen (s. Abb. 18 A). Zusätzlich beeinflußte Ouabain die Ruhewerte der $[Na^+]_i$, $[K^+]_i$ und $[K^+]_e$. $[Na^+]_i$ und $[K^+]_e$ stiegen unter Ouabain an, während $[K^+]_i$ abnahm. Die Akkumulation von intrazellulärem Na^+ und eine entsprechende Abnahme der $[K^+]_i$ sind wahrscheinlich Ausdruck von Ionenfluxen über die Leckleitfähigkeit der Zellmembran, welche die Na^+/K^+-Pumpe unter Kontrollbedingungen durch ihre Ruheaktivität gerade ausgleicht. Vergleichbare Messungen der freien intrazellulären Ionenkonzentrationen mit ionensensitiven Mikroelektroden bei Schneckenneuronen (Thomas, 1972 a) und bei Neuronen des Blutegels (Deitmer & Schlue, 1981, 1983) nach Blockierung der Na^+/K^+-Pumpe durch Ouabain führten zu ähnlichen Ergebnissen.

Bei Vergleich der Kinetik der Veränderungen der $[Na^+]_i$, $[K^+]_i$, $[K^+]_e$ und dem Membranpotential bei Applikation von Carbachol fällt auf, daß eine zeitliche Korrelation zwischen den Ionenverschiebungen und den Membranpotential-Veränderungen besteht (s. Abb. 14). Zum einen setzen sowohl der $[Na^+]_i$-Anstieg als auch der $[K^+]_i$-Abfall verspätet in Bezug auf den Beginn der Membrandepolarisation ein. Dies könnte darauf beruhen, daß die Spitze der ionensensitiven Mikroelektrode in den meisten Fällen vermutlich nicht membrannah positioniert ist, wodurch die Messungen infolge einer vorstellbaren intrazellulären Diffusion der Ionen möglicherweise leicht "verzerrt" werden. Zum anderen dauern sowohl der $[K^+]_e$-undershoot als auch die post-

-Carbachol Hyperpolarisation solange an, bis $[Na^+]_i$ und $[K^+]_i$ ihre Ausgangswerte wieder erreicht haben. Die Beobachtung, daß $[K^+]_i$ für die Dauer des $[K^+]_e$-undershootes unter ihrem Basiswert bleibt, wurde ebenfalls für Photorezeptoren der Bienen-Retina (Coles & Tsacopoulus, 1979), für Retziuszellen des Blutegels (Deitmer & Schlue, 1981) sowie für Motoneurone des Frosches während einer post-Glutamat Hyperpolarisation (Bührle & Sonnhof, 1983 b) oder während der Hyperpolarisation nach tetanischer Stimulation (Grafe et al., 1982) beschrieben. Die Tatsache, daß $[Na^+]_i$ bis zum Ende des $[K^+]_e$-undershootes erhöht bleibt, unterstützt bisherige, theoretische Annahmen über die Kinetik des intrazellulären Na^+ (Förstl et al., 1982; Heinemann & Lux, 1975; Kříž et al., 1975; Krnjević & Morris, 1975; Lothman et al., 1975; Ullrich et al., 1982). Bei der Aktivierung der intrazellulären Bindungsstelle der Na^+/K^+-Pumpe durch akkumuliertes Na^+ scheint unwesentlich zu sein, ob das Na^+ über Rezeptor-gekoppelte oder über spannungsabhängige Na^+-Kanäle in die Zelle gelangte, da kein Unterschied zwischen der Kinetik der Na^+-Extrusion nach Carbachol bzw. nach Veratridine festzustellen war.

Alle diese Beobachtungen bekräftigen, daß die Na^+/K^+-Pumpe der entscheidende Mechanismus bei der Homöostase von Carbachol-induzierten Ionenkonzentrations-Veränderungen ist. Die post-Carbachol bzw. die post-Ouabain Hyperpolarisation läßt auf ein elektrogenes Kopplungsverhältnis von Na^+ und K^+ in Analogie zu der Na^+/K^+-Pumpe bei anderen Neuronen (Thomas, 1972 b) schließen.

4.4 Ionenbewegungen unter GABA

γ-Aminobuttersäure (GABA) ist bekannt als inhibitorischer Transmitter des Zentral-Nervensystems. Im peripheren Nervensystem wurde durch Experimente an sympathischen Ganglien von Säugetieren nachgewiesen, daß die präganglionären Nervenfasern kein GABA freisetzen. Obwohl GABA von daher als Neurotransmitter im peripheren Nervensystem auszuschließen ist, gibt es dort GABA-Rezeptoren, die mit denen im Zentral-Nervensystem identisch sind (Brown, 1979).

Applikation von GABA führt bei Neuronen des Cervicalganglions der Ratte zu einer Membrandepolarisation, die von Veränderungen der freien intrazellulären Konzentrationen von Cl^- und K^+, nicht aber von Na^+, begleitet ist. Die Depolarisation und der vorübergehende $[Cl^-]_i$-Abfall sind bedingt durch die Öffnung von Rezeptor-gekoppelten Cl^--Kanälen. Das Gleichgewichtspotential für Cl^- (E_{Cl}) ist mit -27 mV etwa um 20 mV positiver als das Ruhemembranpotential (s. 4.2). Daher kommt es infolge der GABA-induzierten Erhöhung der Chloridleitfähigkeit der Membran aufgrund der auswärts gerichteten treibenden Kraft für Cl^- zu dem beobachteten Cl^--Abfall infolge eines Cl^--Efflux aus den Zellen. Das Membranpotential nähert sich dementsprechend unter GABA E_{Cl}.

In Übereinstimmung mit dem Abfall der $[Cl^-]_i$ wurde ein vorübergehender Abfall der $[K^+]_i$ und ein entsprechender Anstieg der $[K^+]_e$ gemessen. Eine GABA-induzierte Freisetzung von K^+ in den Extrazellulärraum wurde bereits für das sympathische Ganglion (Förstl et al., 1982), das Dorsalwurzelganglion (Deschenes & Feltz, 1976) bzw. die Hypophyse (Loeffler et al., 1982) der Ratte sowie für das Rückenmark des Frosches (Kudo & Fukuda, 1976; Syková, 1979) beobachtet. Für den neuronalen K^+-Efflux unter GABA gibt es mehrere denkbare Ursachen. Dazu zählt die Aktivierung von Rezeptor-gekoppelten K^+-Kanälen oder von span-

nungsabhängigen K^+-Kanälen aufgrund der GABA-Depolarisation. Denkbar ist auch ein verstärkter K^+-Efflux über Leckkanäle der Membran, der bedingt ist durch die Zunahme der auswärts gerichteten treibenden Kraft für K^+ während der GABA-Depolarisation. Gegen eine Aktivierung von Rezeptor-gekoppelten K^+-Kanälen spricht das Gleichgewichtspotential der GABA-Depolarisation (E_{GABA}, -24 mV), welches mit dem errechneten E_{Cl} (-27 mV) recht gut übereinstimmt. Bei einer Beteiligung von Rezeptor-gekoppelten K^+-Kanälen läge E_{GABA} als Mischpotential zwischen E_{Cl} und E_K. Eine Unterscheidung zwischen den beiden verbleibenden Möglichkeiten ist aufgrund der vorliegenden Daten nicht möglich. Klar ausschließen läßt sich jedoch die Beteiligung einer Na^+-Leitfähigkeit an der GABA-Wirkung, da in keinem Fall GABA-induzierte Veränderungen der $[Na^+]_i$ beobachtet wurden.

Die Na^+/K^+-Pumpe scheint an der Wiederaufnahme des unter GABA freigesetzten K^+ nicht beteiligt zu sein. Diese Vermutung wird durch zahlreiche Beobachtungen bekräftigt. Zum einen führte Applikation von GABA nicht zu einem Anstieg der $[Na^+]_i$, wodurch die Na^+/K^+-Pumpe nicht über ihre intrazelluläre Bindungsstelle aktiviert wird. Außerdem stimuliert das unter GABA freigesetzte K^+ die Na^+/K^+-Pumpe wahrscheinlich nicht von außen, wie die Versuche zeigten, bei denen die extrazelluläre K^+-Konzentration erhöht wurde. Für einen zur Na^+/K^+-Pumpe unterschiedlichen K^+-Transportmechanismus unter GABA spricht einerseits die unterschiedliche Kinetik der K^+-Wiederaufnahme im Vergleich zu der unter Carbachol (vergl. Abb. 8, 12). Zum anderen wurden keine post-GABA Hyperpolarisationen oder $[K^+]_e$-undershoots, welche typische Indikatoren für die Aktivierung eines elektrogenen Na^+/K^+-Transportsystems sind, beobachtet. Außerdem war in der Anwesenheit von Ouabain die Kinetik der post-GABA $[K^+]_e$-Rückkehrperiode unverändert, während die Rückkehr der $[K^+]_e$ nach Carbachol verzögert und der post-Carbachol $[K^+]_e$-undershoot vollkommen blockiert waren.

Der ähnliche Zeitverlauf der K^+- bzw. Cl^--Wiederaufnahme nach GABA legt unter Einbeziehung der Einwände gegen eine Aktivierung der Na^+/K^+-Pumpe die Vermutung nahe, daß K^+ und Cl^- gemeinsam wieder in die Zelle transportiert werden. Es wäre denkbar, daß beim Cervicalganglion der Ratte ein K^+/Cl^--Cotransport diese Funktion übernimmt. Dabei handelt es sich möglicherweise um einen elektroneutralen $Na^+/K^+/Cl^-$-Cotransport (1 Na^+ : 1 K^+ : 2 Cl^-), der für eine Vielzahl von Geweben beschrieben wurde (Haas et al., 1982; Aiton et al., 1981; Greger & Schlatter, 1981; Geck et al., 1980). Die Annahme eines derartigen Cotransportes wird unterstützt durch die Aussagen, die durch das Diuretikum Furosemid gewonnen wurden. Furosemid blockiert reversibel die Wiederaufnahme von K^+ und Cl^-, welche unter GABA freigesetzt werden. Eine Blockierung Cl^--abhängiger K^+-Influxe durch Furosemid wurde für eine Reihe von Präparaten wie Erythrozyten (Dunham et al., 1980; Duhm & Göbel, 1984), die Henlesche Schleife der Kaninchen-Niere (Greger et al., 1983), Zellen in Kultur (bes. HeLa-Zellen; Aiton et al., 1981; Geck et al., 1980) oder das Riesenaxon des Tintenfisches (Russell, 1983) nachgewiesen. Zusätzlich spiegelt die verlängerte post-GABA Rückkehrperiode der $[K^+]_e$ unter Furosemid die Blockierung der Wiederaufnahme des freigesetzten K^+ in die Zellen wieder. Die diesen Effekten überlagerte Reduzierung der Amplituden des GABA-induzierten $[K^+]_e$-Anstieges sowie der GABA-Depolarisation durch Furosemid kann mehrere Ursachen haben. Einerseits könnte Furosemid den Chloridkanal, der mit dem GABA-Rezeptor assoziiert ist, direkt blockieren. Ein derartiger Effekt auf die Chloridleitfähigkeit wurde z.B. für Dorsalwurzel-Terminalen des Frosches (Nicoll, 1978) oder für das Dorsalwurzel-Ganglion der Katze (Gallagher et al., 1983) beschrieben. Andererseits nähert sich E_{Cl} aufgrund des sukzessiven GABA-induzierten Abfalles der $[Cl^-]_i$ dem Ruhemembranpotential.

Der Ouabain-sensitive, durch Furosemid hemmbare $Na^+/K^+/Cl^-$-Cotransport scheint beim Cervicalganglion auch unter Ruhebedingungen aktiviert zu sein, indem er dazu beiträgt, KCl, welches über die Leckleitfähigkeit der Membran aus den Zellen diffundiert, zurück zu transportieren. Für diese Hypothese spricht die Beobachtung, daß bei Superfusion mit Furosemid auch ohne Applikation von GABA sowohl $[K^+]_i$ als auch $[Cl^-]_i$ abfallen (vergl. Abb. 19 A, 20 und 21 C). Ussing (1982) berichtet, daß ein vergleichbarer Transportmechanismus beim Epithel der Froschhaut möglicherweise zur Volumenregulation der Zellen dient. Denn bei Erhöhung der Cl^--Leitfähigkeit der Membran verlieren die Froschhautzellen aufgrund von Zellschwellung KCl. Ussing nimmt an, daß der Cotransport hautsächlich durch die daraus resultierende Erniedrigung der $[Cl^-]_i$ aktiviert wird. Die Aktivierung eines $Na^+/K^+/Cl^-$-Cotransportes aufgrund einer erniedrigten $[Cl^-]_i$ wird auch für Zellen in Kultur (Hoffmann, 1982) vermutet. Verschiedene Autoren nehmen an, daß der $Na^+/K^+/Cl^-$-Cotransport bei Epithelien mit niedrigem Membranwiderstand zur Regulation von Flüssigkeitstransporten dient, während bei anderen Zellen eine Beteiligung an der Volumenregulation denkbar ist (Geck et al., 1980; Musch et al., 1982; Schmidt & McManus, 1974). Andere Autoren sehen in diesem Cotransport eine "zweite Pumpe" (Hoffman & Kregenow, 1966) zusätzlich zur Na^+/K^+-Pumpe.

Über die Beteiligung von Na^+ an diesem Cotransport läßt sich sagen, daß möglicherweise der große elektrochemische Na^+-Potentialgradient für den Bergauf-Transport von K^+ bzw. Cl^- genutzt wird (Frizzell et al., 1979). Die Befunde von Russell (1979) am Tintenfisch Riesenaxon, denen zufolge die Erhöhung der $[Na^+]_i$ von 8 auf 158 mmol/l keinen Einfluß auf den Cl^--Efflux hatte, sprechen jedoch gegen die Vorstellung von einem reversiblen hauptsächlich Gradienten-getriebenen Prozess. Vorläufige Ergebnisse beim Cervicalganglion der Ratte (eigene Beobachtungen) deuten andererseits darauf hin, daß bei Erniedrigung der $[Na^+]_e$ die Wiederaufnahme von unter GABA freigesetztem Cl^- blockiert wird.

Als alternativer bzw. zusätzlicher Transportmechanismus für die Wiederaufnahme von Cl^- nach der Wirkung von GABA wäre die Beteiligung eines aus der Literatur z.B. für die Harnblase der Schildkröte (Leslie et al., 1973) oder für das Colon des Kaninchens (Frizzell, 1977) bekannten Cl^-/HCO_3^--Austausches denkbar. Ein derartiger Anionen-Austausch wurde ebenfalls bei glatten Muskelzellen des Harnleiters (Aickin & Vermuë, 1983) bzw. des Vas deferens (Aickin & Brading, 1982, 1983) von Meerschweinchen oder bei Schafherz Purkinjefasern (Vaughan-Jones 1979, a, b) beobachtet. Für diese Präparationen berichten die Autoren, daß die Reakkumulation von freigesetztem Cl^- in HCO_3^--freier Lösung inhibiert wird und auch der Ruhewert der $[Cl^-]_i$ infolge der Hemmung einer mutmaßlichen, einwärts gerichteten, Cl^--Pumpe in HCO_3^--freier Lösung abnimmt. Bei den glatten Muskelzellen des Harnleiters bzw. des Vas deferens des Meerschweinchens scheint in Anwesenheit des Stilbene-Präparates DIDS, einem spezifischen Hemmstoff des Anionen-Austausches (Cala, 1980, 1983), ähnlich wie in HCO_3^--freier Lösung die Reakkumulation von Cl^- inhibiert zu sein (Aickin & Brading, 1982, 1983). Im Gegensatz dazu hatte DIDS beim Cervicalganglion weder auf den Ruhewert der $[Cl^-]_i$ noch auf die Cl^--Wiederaufnahme nach GABA einen Einfluß. Auch in HCO_3^--freier HEPES-Ringerlösung war weder eine Abnahme der $[Cl^-]_i$ unter Ruhebedingungen, noch eine Beeinflussung des GABA-induzierten vorübergehenden Cl^--Abfalls festzustellen. Obwohl der Cl^-/HCO_3^--Austausch beim Cervicalganglion der Ratte noch genauer untersucht werden muß, scheint dieser Transportmechanismus zumindest bei der Regulation von GABA-induzierten Cl^--Verschiebungen keine bedeutende Rolle zu spielen.

4.5 Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten zeigen, daß sich die Technik der doppelläufigen ionensensitiven Mikroelektroden dazu eignet, Reiz- oder Neurotransmitter-induzierte intrazelluläre Ionenbewegungen bei Säugetierneuronen zu messen. Dabei ergaben sich zahlreiche Hinweise auf einen Mechanismus der ionalen Homöostase beim Cervicalganglion der Ratte, der sich von der ebenfalls untersuchten Na^+/K^+-Pumpe unterscheidet. Dabei hat es den Anschein, daß die Aktivierung des jeweiligen Ionen-Transportmechanismus von der Art der Ionen-Fluxe abhängt. Es konnte gezeigt werden, daß bei Aktivierung der Acetylcholinrezeptoren durch Carbachol die intrazelluläre Na^+-Konzentration etwa in dem Maße ansteigt, wie die intrazelluläre K^+-Konzentration abfällt. Da außerdem die intrazelluläre Cl^--Konzentration von Carbachol unbeeinflußt bleibt, ist zu vermuten, daß es bei der Aktion von Carbachol zu keinem nennenswerten Nettoflux von Ionen über die Membran kommt. Damit dürfte es vermutlich zu keinen Veränderungen des osmotischen Gleichgewichtes zwischen Intra- und Extrazellulärraum kommen. Demzufolge ist die beobachtete Aktivierung der Na^+/K^+-Pumpe im Anschluß an die Wirkung von Carbachol ausreichend, um die ursprünglichen Ionengradienten für Na^+ und K^+ wiederherzustellen.

Im Gegensatz zu der Wirkung von Carbachol kam es bei Aktivierung der GABA-Rezeptoren durch GABA zu einem quantitativ vergleichbaren Ausstrom von K^+ und Cl^- aus den Zellen, wohingegen die intrazelluläre Na^+-Konzentration unverändert blieb. Obwohl dadurch, vergleichbar zu der Applikation von Carbachol, vermutlich kein Nettoflux von Ladungen über die Membran auftritt, kommt es zu einem intrazellulären Verlust von Ionen, was das osmotische Gleichgewicht zwischen Intra- und Extrazellulärraum stören und z.B. einen Ausstrom von Wasser induzieren könnte. Dies hätte eine Schrumpfung der Zellen zur Folge. Derartige Prozesse, die, wie bereits erwähnt, z.B. an Erythrozyten gut untersucht sind, aktivieren in vielen Fällen einen (volumensensi-

tiven) $Na^+/K^+/Cl^-$-Cotransport. Die Versuche in dieser Arbeit deuten darauf hin, daß es einen entsprechenden ionalen Regulationsmechanismus auch bei den Neuronen des Cervicalganglions der Ratte gibt.

Zukünftige Untersuchungen mit Hilfe ionensensitiver Mikroelektroden sollten darauf hinzielen, den hypothetischen $Na^+/K^+/Cl^-$-Cotransport näher zu charakterisieren. Die Abhängigkeit dieses Transportmechanismus von den extrazellulären Konzentrationen für Na^+ und K^+ könnte durch Variation dieser Konzentrationen bzw. durch Substitution des Na^+ mit Cholin oder Tris geklärt werden. Die Verwendung von "ionensensitiven" Verstärkern mit Möglichkeit zur Injektion von DC-Strömen eröffnet die Möglichkeit zur Untersuchung von intrazellulären Ionenbewegungen bei konstant gehaltenem Membranpotential ("manual voltage-clamp"). Dadurch könnte die Beteiligung spannungsabhängiger Ionenströme an den beobachteten Ionenbewegungen analysiert werden.
Schließlich wäre es wünschenswert, durch Verwendung von Flüssig--Ionenaustauschern etwa für Ca^{++} oder H^+-Ionen die Beteiligung weiterer Ionenfluxe an den Neurotransmitter Aktionen zu messen. Denn die Beobachtungen, daß Neurotransmitter-induzierte Bewegungen bestimmter Ionen Verschiebungen anderer Ionen nach sich ziehen können (Somjen, 1979; Nicholson, 1981), deuten darauf hin, daß auch im Nervensystem von Säugetieren die ionale Homöostase sehr komplex ist.

5. Zusammenfassung

1. Beim Ganglion cervicale superius der Ratte wurden mit Hilfe von doppelläufigen ionensensitiven Mikroelektroden Veränderungen der freien extrazellulären K^+-Konzentration ($[K^+]_e$) sowie der freien intrazellulären Konzentrationen von Na^+, K^+ und Cl^- ($[Na^+]_i$, $[K^+]_i$ bzw. $[Cl^-]_i$) simultan mit dem Membranpotential gemessen. Die Ruhewerte der intrazellulären Konzentrationen für die Neurone des Cervicalganglions lagen im Mittel bei 7.7 mmol/l für $[Na^+]_i$, 129.7 mmol/l für $[K^+]_i$ und 41 mmol/l für $[Cl^-]_i$.

2. Applikation des Acetylcholin-Agonisten Carbachol resultierte in einer Membrandepolarisation, die von einem vorübergehenden Anstieg der $[Na^+]_i$ um 10 bis 40 mmol/l und einem entsprechenden Abfall der $[K^+]_i$ begleitet war. $[Cl^-]_i$ blieb im Gegensatz dazu unter Carbachol unverändert. Veratridine führte zu Membrandepolarisationen und Anstiegen der $[Na^+]_i$, die denen unter Carbachol sehr ähnlich waren. Tetrodotoxin (TTX) blockierte die Veratridine-Antwort vollständig, wohingegen die Carbachol-Antwort von TTX unbeeinflußt blieb.

3. Die Na^+/K^+-Pumpe scheint für die Wiederherstellung der Ionengradienten für Na^+ und K^+ im Anschluß an die Carbachol-Wirkung verantwortlich zu sein. Diese Annahme wird unterstützt durch die Beobachtung, daß die Zeitverläufe der Na^+-Extrusion bzw. der K^+-Wiederaufnahme sowohl mit der post-Carbachol Hyperpolarisation als auch mit dem Carbachol-induzierten $[K^+]_e$-"undershoot" korrelierten. Die Na^+-Extrusion, die K^+-Wiederaufnahme sowie der $[K^+]_e$-undershoot nach der Wirkung von Carbachol ließen sich reversibel durch Ouabain, einen spezifischen Hemmstoff der Na^+/K^+-Pumpe, blockieren.

4. Applikation von γ-Aminobuttersäure (GABA) resultierte in einer Membrandepolarisation, die von vorübergehenden Abfällen der $[Cl^-]_i$ und der $[K^+]_i$ um maximal 20 mmol/l begleitet war. $[Na^+]_i$ blieb im Gegensatz dazu unverändert.

5. Die Na^+/K^+-Pumpe scheint für die Wiederaufnahme von K^+ nach GABA nicht verantwortlich zu sein, da ihre intrazelluläre Bindungsstelle für Na^+ unter GABA nicht aktiviert wird. Diese Annahme wird durch die Beobachtungen bekräftigt, daß freigesetztes K^+ die Na^+/K^+-Pumpe von außen nicht stimuliert und Ouabain keinen Einfluß auf die Kinetik der GABA-induzierten Anstiege der $[K^+]_e$ hat.

6. Möglicherweise ist die Aktivierung eines K^+/Cl^--Cotransportes für die Wiederaufnahme von K^+ und Cl^- im Anschluß an die Wirkung von GABA verantwortlich. Denkbar wäre, daß es sich hierbei um einen elektroneutralen $Na^+/K^+/Cl^-$-Cotransport handelt. Für einen derartigen Regulationsmechanismus sprechen die Beobachtungen, daß Furosemid sowohl die Wiederaufnahme von K^+ als auch von Cl^- in die Zellen blockierte und zusätzlich die Rückkehr des post-GABA $[K^+]_e$-Anstieges verzögerte. Die Beteiligung eines Cl^-/HCO_3^--Austausches an der Regulation der $[Cl^-]_i$ nach der Wirkung von GABA ist nicht wahrscheinlich, da weder unter DIDS noch in HCO_3^--freier Krebslösung die Wiederaufnahme von Cl^- in die Zellen blockiert wurde.

7. Die Ergebnisse zeigen zum einen, daß die Technik der doppelläufigen ionensensitiven Mikroelektroden dazu geeignet ist, Veränderungen der freien intrazellulären Ionenkonzentrationen simultan mit dem Membranpotential bei Säugetierneuronen zu messen. Zum anderen konnten mit Hilfe dieser Technik Hinweise auf einen Mechanismus zur Ionenregulation bei Säugetier-Nervenzellen, der unterschiedlich zur Na^+/K^+-Pumpe ist, gewonnen werden.

LITERATURVERZEICHNIS

Adams, P. R., Brown, D. A. (1975). Actions of γ-aminobutyric acid on sympathetic ganglion cells. J. Physiol. 250, 85-120.

Adams, P. R., Brown, D. A. & Constanti, A. (1982). M-currents and other potassium currents in bullfrog sympathetic neurones. J. Physiol. 330, 537-572.

Aickin, C. C. & Brading, A. F. (1982). The effect of CO_2/HCO_3 and DIDS on Cl movements in guinea-pig vas deferens. J. Physiol. 327, 74-75 P.

Aickin, C. C. & Brading, A. F. (1983). Towards an estimate of chloride permeability in the smooth muscle of guinea-pig vas deferens. J. Physiol. 336, 179-197.

Aickin, C. C. & Vermuë, N. A. (1983). Microelectrode measurement of intracellular chloride activity in smooth muscle cells of guinea-pig ureter. Pflügers Arch. 397, 25-28.

Aiton, J. F., Chipperfield, A. R., Lamb, J. F., Ogden, P. & Simmons, N. L. (1981). Occurrence of passive furosemide--sensitive transmembrane potassium transport in cultured cells. Biochim. Biophys. Acta 646, 389-398.

Ascher, P., Large, W. A. & Rang, H. P. (1979). Studies on the mechanism of action of acetylcholine antagonists on rat parasympathetic ganglion cells. J. Physiol. 295, 139-170.

Baker, P. F. & Schlaepfer, W. (1978). Uptake and binding of calcium by axoplasm isolated from giant axons of Loligo and Myxicola. J. Physiol. 276, 103-125

Ballanyi, K., Grafe, P. & ten Bruggencate G. (1983). Intracellular free sodium and potassium, post-carbachol hyperpolarization and extracellular potassium-undershoot in rat sympathetic neurones. Neurosci. Lett. 38, 275-279.

Baumgarten, C. M. (1981). An improved liquid ion-exchanger for chloride ion-selective microelectrodes. Am. J. Physiol. 241, 258-263.

Bowery, N. G. & Brown, D. A. (1974). Depolarizing actions of γ-aminobutyric acid and related compounds on rat superior cervical ganglia in vitro. Br. J. Pharmacol. 50, 205-218.

Brown, D. A. (1983). Slow cholinergic excitation - a mechanism for increasing neuronal excitability. Trends in Neurosci. 2, 302-307.

Brown, D. A. (1979). Extrasynaptic GABA systems. Trends in Neurosci. 4, 271-273.

Brown, D. A., Brownstein, M. J. & Scholfield, C. N. (1972). Origin of the after-hyperpolarization that follows removal of depolarizing agents from the isolated superior cervical ganglion of the rat. Brit. J. Pharmac. 44, 651-671.

Brown, D. A., Halliwell J. V. & Scholfield, C. N. (1971). Uptake of nicotine and extracellular space markers by isolated rat ganglia in relation to receptor activation. Br. J. Pharmac. 42, 100-113.

Brown, D. A. & Scholfield, C. N. (1974). Changes of intracellular sodium and potassium ion concentrations in isolated rat superior cervical ganglia induced by depolarizing agents. J. Physiol. 242, 307-319.

Brown, K. T. & Flaming, D. G. (1977). New microelectrode techniques for intracellular work in small cells. Neuroscience 2, 813-827.

Buck, R. P. (1974). Ion selective electrodes, potentiometry and potentiometric titrations. Anal. Chem. 46, 28R-51R.

Bührle, Ch. Ph. & Sonnhof, U. (1983 a). Intracellular ion activities and equilibrium potentials in motoneurones and glia cells of the frog spinal chord. Pflügers Arch. 396, 144-153.

Bührle, Ch. Ph. & Sonnhof, U. (1983 b). The ionic mechanism of the excitatory action of glutamate upon the membranes of motoneurones of the frog. Pflügers Arch. 396, 154-162.

Cabantchik, Z. I., Knauf, P. A. & Rothstein, A. (1978). The anion transport system of the red blood cell. The role of membrane protein evaluated by the use of "probes". Biochim. Biophys. Acta 515, 239-302.

Cabantchik, Z. I. & Rothstein, A. (1974). Membrane proteins related to anion permeability of human red blood cells. I. Location of disulfonic stilbene binding sites in proteins involved in permeation. J. Membr. Biol. 15, 207-226.

Cala, P. M. (1983). Volume regulation by red blood cells. Mechanisms of ion transport between cells and mechanisms. Molec. Physiol. 4, 33-52.

Cala, P. M. (1980). Volume regulation by Amphiuma red blood cells. J. gen. Physiol. 76, 683-708.

Coles, J. A. & Tsacopoulus, M. (1979). Potassium activity in photoreceptors, glial cells and extracellular space in the drone retina: Changes during photostimulation. J. Physiol. 290, 525-549.

Deisz, R. A. & Lux, H. D. (1982). The role of intracellular chloride in hyperpolarizing post-synaptic inhibition of crayfish stretch receptor neurones. J. Physiol. 326, 123-138.

Deitmer, J. W. & Schlue, W. R. (1981). Measurements of the intracellular potassium activity of Retzius cells in the leech central nervous system. J. exp. Biol. 91, 87-101.

Deitmer, J. W. & Schlue, W. R. (1983). Intracellular Na^+ and Ca^{2+} in leech Retzius neurones during inhibition of the Na^+-K^+-pump. Pflügers Arch. 397, 195-201.

Deschenes, M. & Feltz, P. (1976). GABA-induced rise of extracellular potassium in rat dorsal root ganglia: an electrophysiological study in vivo. Brain Res. 118, 494-499.

Duhm, J. & Göbel, B.O. (1984). Role of the furosemide-sensitive Na^+-K^+ transport system in determining the steady-state Na^+ and K^+ content and volume of human erythrocytes in vitro and in vivo. J. Membr. Biol. (im Druck).

Dunham, P. B. Stewart, G.W. & Ellory, J.C. (1980). Chloride-activated passive potassium transport in human erythrocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. 77, 1711-1715.

Edwards, C. (1982). The selectivity of ion channels in nerve and muscle. Neuroscience 7, 1335-1366.

Ellis, D. (1977). The intracellular sodium ion concentration of sheep heart Purkinje fibres and its relationship to external sodium. J. Physiol. 266, 74-75P.

Ellory, J. C., Dunham, P. B., Logue, P. J. & Stewart, G. O. (1982). Anion-dependent cation transport in erythrocytes. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 299, 483-495.

Förstl, J., Galvan, M. & ten Bruggencate, G. (1982). Extracellular K^+-concentration during electrical stimulation of rat isolated sympathetic ganglia, vagus and optic nerves. Neuroscience 7, 3221-3229.

Friedli, C. (1978). Kinetics of changes in pO_2 and extracellular potassium activity in stimulated rat ganglia. In Adv. in Exp. Biol. and Med. 94. Plenum Press, N. Y.

Frizzel, R.A. (1977). Active chloride secretion by rabbit colon: calcium-dependent stimulation by ionophore A 23187. J. Membr. Biol. 35, 175-187.

Frizell, R. A., Field, M. & Schultz, S. G. (1979). Sodium-coupled chloride transport by epithelial tissues. Am. J. Physiol. 236, F1-F8.

Frizell, R. A., Smith, P. L., Vosburgh, E. & Field, M. (1980). Coupled sodium-chloride influx across brush border of flounder. J. Membr. Biol. 55, 157-163.

Gallagher, J. P., Higashi, H. & Nishi, S. (1978). Characterization and ionic basis of GABA-induced depolarizations recorded in vitro from cat primary afferent neurones. J. Physiol. 275, 263-282.

Gallagher, J. P., Nakamura, J. & Shinnick-Gallagher, P. (1983). The effects of temperature, pH and Cl-pump inhibitors on GABA responses recorded from cat dorsal root ganglia. Brain Res. 267, 249-259.

Galvan, M., Dörge, A., Beck, F. & Rick, R. (1984). Intracellular electrolyte concentrations in rat sympathetic neurones measured with an electron microprobe. Pflügers Arch. (im Druck).

Geck, P., Pietrzyk, C., Burckhardt, B.C., Pfeiffer, B. & Heinz, E. (1980). Electrically silent cotransport of Na^+, K^+ and Cl^- in Ehrlich cells. Biochim. Biophys. Acta 600, 432-447.

Glynn, I. M. (1964). The action of cardiac glycosides on ion movements. Pharmacol. Rev. 16, 381-407.

Grafe, P., Rimpel, J., Reddy, M. M. & ten Bruggencate, G. (1982). Changes of intracellular sodium and potassium ion concentrations in frog spinal motoneurones induced by repetitive synaptic stimulation. Neuroscience 7, 3213-3220.

Greger, R., & Schlatter, E. (1981). Presence of luminal K^+, a prerequisite for active NaCl transport in the cortical thick ascending limb of Henle´s loop of rabbit kidney. Pflügers Arch. 392, 92-94.

Greger, R., Schlatter, E. & Lang, F. (1983). Evidence for electroneutral sodium chloride cotransport in the cortical thick ascending limb of Henle´s loop of rabbit kidney. Pflügers Arch. 396, 308-314.

de Groat, W.C. (1970). The actions of GABA and related amino acids on mammalian autonomic ganglia. J. Pharmacol. Exp. Ther. 172, 384-396.

Haas, M., Schmidt, W. F. & McManus, T. J. (1982). Catecholamine--stimulated ion transport in duck red cells: gradient effects in electrically neutral [Na + K + 2 Cl] Co-Transport. J. gen. Physiol. 80, 125-147.

Heinemann, U. & Lux, H. D. (1975). Undershoots following stimulus-induced rises of extracellular potassium concentration in cerebral cortex of cat. Brain Res. 93, 63-76.

Hoffmann, E. K. (1982). Anion exchange and anion-cation co-transport systems in mammalian cells. Phil. Trans. R. Soc. London. B. 299, 519-535.

Hoffmann, J. F. & Kregenow, F. M. (1966). The characterization of new energy dependent cation transport processes in red blood cells. Am. N. Y. Acad. of Sciences 137, 566-576.

Hofmeier, G. & Lux, H. D. (1981). The time courses of intracellular free calcium and related electrical effects after injection of $CaCl_2$ into neurons of the snail, Helix pomatia. Pflügers Arch. 319, 242-251.

Keynes, R. D. (1963). Chloride in the squid giant axon. J. Physiol. 169, 690-705.

Knauf, P. A., Fuhrman, G. F., Rothstein, S. & Rothstein, A. (1977). The relationship between anion exchange and net anion flow across the human red blood cell membrane. J. gen. Physiol. 69, 363-386.

Kříž, N., Syková, E. & Vyklický, L. (1975). Extracellular potassium changes in the spinal cord of the cat and their relation to slow potentials, active transport and impulse transmission. J. Physiol. 249, 167-182.

Krnjevic´, K. & Morris, M. E. (1975). Factors determining the decay of K^+-potentials and focal potentials in the central nervous system. Canad. J. Physiol. Pharmacol. 53, 923-934.

Krnjevic´, K. & Schwartz, S. (1967). The action of γ-amino butyric acid on cortical neurones. Exp. Brain Res. 3, 320-336.

Kudo, Y. & Fukuda, H. (1976). Alteration of extracellular K^+-activity induced by amino acids in the frog spinal cord. Jap. J. Pharmacol. 26, 385-387.

Lee, C. O. & Fozzard, H. A. (1975). Activities of potassium and sodium ion in rabbit heart muscle. J. gen. Physiol. 65, 695-708.

Lee, K.S. & Klaus, W. (1971). The subcellular basis for the mechanism of inotropic action of cardiac glycosides. Pharmacol. Rev. 23, 193-261.

Leslie, B. R., Schwartz, J. H. & Steinmetz, P. R. (1973). Coupling between Cl^- absorption and HCO_3^- secretion in turtle urinary bladder. Am. J. Physiol. 225, 610-617.

Lev, A. A. (1964). Determination of activity and activity coefficients of potassium and sodium ions in frog muscle fibres. Nature 201, 1132-1134.

Loeffler, J. Ph., Desaulles, E., Demeneix, B. A. & Feltz, P. (1982). Electrophysiological study with K^+-and Ca^{2+}-sensitive micropipettes of GABA receptors in the rat neurointermediate lobe in vitro. Neurosci. Lett. 34, 271-276.

Lothman, E., La Manna, J., Cordingley, G., Rosenthal, M. & Somjen, G. (1975). Responses of electrical potential, potassium levels, and oxidative metabolic activity of the cerebral neocortex of cats. Brain Res. 88, 15-36.

Lux, H. D. (1971). Ammonium and chloride extrusion: Hyperpolarizing synaptic inhibiton in spinal motoneurons. Science 173, 555-557.

Musch, M. W., Orellana, S. A., Kimberg, L. S., Field, M., Halm, D. R., Krasny, E. J. jr. & Frizzell, R. A. (1982). Na^+-K^+-Cl^- co-transport in the intestine of a marine teleost. Nature 300, 351-353.

Narahashi, T. (1974). Chemicals as tools in the study of excitable membranes. Physiol. Rev. 54, 813-889.

Nicholson, C. (1981). Brain-cell microenvironment as a communication channel. In: The Neurosciences-Fourth Study Program, (ed. Schmidt F. O. and Worden F.). pp. 457-476. MIT-Press, Cambridge, MA USA.

Nicoll, R. A. (1978). The blockade of GABA mediated responses in frog spinal cord by ammonium ions and furosemide. J. Physiol. 283, 121-132.

O´Doherty, J., Garcia-Diaz, J. F. & Armstrong, W. MCD. (1979). Sodium-selective liquid ion-exchanger microelectrodes for intracellular measurements. Science, 203, 1349-1351.

Oehme, M. (1977). Beitrag zur Entwicklung ionensensitiver Mini- und Mikroelektroden und zu deren Meßtechnik. Dissertation, Eidgenössische Technische Hochschule Zürich.

Robinson, R. A. & Stokes, R. H. (1959). Electrolyte solutions. Butterworth, London.

Russell, J. M. (1983). Cation-coupled chloride influx in squid axon. Role of potassium and stoichiometry of the transport process. J. gen. Physiol. 81, 909-925.

Russell, J. M. (1979). Chloride and sodium influx: a coupled intake mechanism in the squid giant axon. J. gen. Physiol. 73, 801-818.

Russell, J. M. & Brown, A. M. (1972). Active transport of chloride by the giant neuron of the Aplysia abdominal ganglion. J. gen. Physiol. 60, 499-518.

Schlue, W. R. & Deitmer, J. W. (1980). Extracellular potassium in neuropile and nerve cell body region of the leech central nervous system. J. exp. Biol. 87, 23-43.

Schmidt, W. F. & McManus, T. J. (1974). A furosemide-sensitive cotransport of Na plus K into duck red cells activated by hypertonicity or catecholamines. Fed. Proc. 33, 1457.

Scholfield, C. N. (1977). Movements of radioactive potassium in isolated rat ganglia. J. Physiol. 268, 123-137.

Somjen, G. G. (1979). Extracellular potassium in the mammalian central nervous system. Ann. Rev. Physiol. 41, 159-177.

Steiner, R. A., Oehme, M., Ammann, D. & Simon, W. (1979). Neutral carrier sodium ion-selective microelectrode for intracellular studies. Anal. Chem. 51, 351-353.

Syková, E. (1979). GABA-induced changes of extracellular K^+-activity in the frog spinal cord. Physiologia Bohemoslovaca 27, 189-192.

Thomas, R. C. (1969). Membrane current and intracellular sodium changes in a snail neurone during extrusion of injected sodium. J. Physiol. 201, 495-514.

Thomas, R. C. (1972 a). Intracellular sodium activity and the sodium pump in snail neurones. J. Physiol. 220, 55-71.

Thomas, R. C. (1972 b). Electrogenic sodium pump in nerve and muscle cells. Physiol. Rev. 52, 563-594.

Thomas, R. C. (1977). The role of bicarbonate, chloride and sodium ions in the regulation of intracellular pH in snail neurones. J. Physiol. 273, 317-338.

Thomas, R. C. (1978). Ion sensitive intracellular microelectrodes: how to make and use them. Academic Press, London.

Thomas, R. & Cohen, C. J. (1981). A liquid ion exchanger alternative to KCl for filling intracellular reference electrodes. Pflügers Arch. 390, 96-98.

Ullrich, A., Steinberg, R., Baierl, P. & ten Bruggencate, G. (1982). Changes in extracellular potassium and calcium in rat cerebellar cortex related to local inhibition of the sodium pump. Pflügers Arch. 395, 108-114.

Ussing, H. H. (1982). Volume regulation of frog skin epithelium. Acta Physiol. Scand. 114, 363-369.

Vaughan-Jones, R. D. (1979 a). Non-passive chloride distribution in mammalian heart muscle: micro-electrode measurement of the intracellular chloride activity. J. Physiol. 295, 83-109.

Vaughan-Jones, R. D. (1979 b). Regulation of chloride in quiescent sheep-heart Purkinje fibres studied using intracellular chloride and pH-sensitive micro-electrodes. J. Physiol. 295, 111-137.

Walker, J. L. & Brown, H. M. (1977). Intracellular ionic activity measurements in nerve and muscle. Physiol. Rev. 57, 729-778.

Walz, W. & Hertz, L. (1983). Functional interactions between neurons and astrocytes. II. Potassium homeostasis at the cellular level. Progr. Neurobiol. 20, 133-183.

Warnock, D. G. & Eveloff, J. (1982). NaCl entry mechanisms in the luminal membrane of the renal tubule. Am. J. Physiol. 242, F561-F574.

Wiley, J. S. & Cooper, R. A. (1974). A furosemide sensitive co-transport of sodium plus potassium in the human red cell. J. Clin. Invest. 53, 745-755.

Woodward, J. K., Bianchi, C. P. & Erulkar, S. D. (1969). Electrolyte distribution in rabbit superior cervical ganglion. J. Neurochem. 16, 289-299.

Yoshikami, D. (1981). Transmitter sensitivity of neurons assayed by autoradiography. Science 212, 929-930.

Ich danke den Mitarbeitern des Physiologischen Instituts der LMU, namentlich Fr. Chr. Müller für die Präparationen und die Anfertigung der Reinschrift und Fr. I. Englmaier für die Konstruktion der Elektroden. Fr. G. Schneider gilt mein Dank für gewissenhafte Assistenz bei vielen technischen Arbeiten, besonders bei der Herstellung der Elektroden.

Herrn Prof. Dr. G. ten Bruggencate danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie für hilfreiche Gespräche und Anmerkungen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv. Doz. Dr. P. Grafe für die Vergabe der Themenstellung, eine hervorragende Betreuung der Arbeit und seine stete Bereitschaft zur Diskussion. Das letztere gilt ebenso für Herrn Priv. Doz. Dr. M. Galvan, dem ich außerdem für experimentelle und inhaltliche Anregungen danken möchte.

Herrn Prof. Dr. G. Neuweiler vom Zoologischen Institut der LMU möchte ich für sein Interesse und die Bereitschaft danken, diese Arbeit vor der Biologischen Fakultät der LMU zu vertreten.

Lebenslauf:

Am 13. 7. 1956 wurde ich als Sohn von Paul und Frieda Ballanyi in Duisburg geboren.

Nach dem Besuch der Grundschule in Duisburg trat ich, ebenfalls in Duisburg, in das Reinhard und Max Mannesmann Gymnasium ein, wo ich im Juni 1975 die Reifeprüfung ablegte.

Im Wintersemester 1976/77 begann ich an der Ruhr Universität Bochum das Studium der Biologie, welches ich im Januar 1982 mit Bestehen der Diplom-Hauptprüfung abschloß.

Seit dem 1. Juni 1982 arbeite ich als Wissenschaftliche Hilfskraft am Physiologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München, Lehrstuhl Prof. Dr. G. ten Bruggencate.